



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**UVOLŇOVÁNÍ SOLUBILIZOVANÝCH LÁTEK Z FÁZOVĚ
SEPAROVANÝCH HYDROGELŮ**

RELEASING OF THE SOLUBILIZED SUBSTANCES FROM THE PHASE-SEPARATED HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martina Havlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1138/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Martina Havlíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Uvolňování solubilizovaných látek z fázově separovaných hydrogelů

Zadání bakalářské práce:

1. V dostupné literatuře zjistit informace o fázově separovaných hydrogelech vznikajících interakcí polyelektrolyt–tenzid.
2. Zvládnout přípravu takovýchto hydrogelů v systému hyaluronan–kationaktivní tenzid s vhodnými solubilizovanými modelovými látkami a stanovit solubilizační kapacitu takovýchto systémů.
3. U vybraných hydrogelů spektrofotometricky stanovit, jestli se solubilizované látky uvolňují a jejich uvolněné množství po 24, 48 a 72 hodinách.
4. Výsledky shrnout z hlediska struktury solubilizovaných látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martina Havlíková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá uvolňováním solubilizovaných látek z fázově separovaných hydrogelů. Cílem práce je stanovit jejich solubilizační kapacitu. Hydrogely byly připraveny na základě interakce záporně nabitého polymeru (hyaluronan) a kladně nabitého tenzidu (Septonex) a byly připraveny dvěma možnými způsoby, tzv. „mokrou“ a „suchou cestou“. K solubilizačním experimentům byl použit fluorescein a akridinová oranž, jakožto fluorescenční sondy. K určení, zda se z hydrogelu dané látky uvolňují nebo ne, byla primárně použita metoda UV-VIS spektrofotometrie, kdy jednotlivá měření probíhala po 24, 48 a 72 hodinách od doby jejich přípravy. Tato metoda se ale později ukázala jako nevhodná a nepřesná z důvodů vzniku zakalených supernatantů nad vzniklými gely a nízkých koncentrací fluorescenčních sond v tomto roztoku. Z těchto důvodů byla zvolena metoda měření na základě fluorescence těchto sond pomocí přístroje MicroTime 200. Jedná se o velice přesný přístroj, proto výsledky z tohoto měření byly brány jako relevantní. Výsledky byly shrnuty na základě použití fluorescenčních sond, kdy bylo prokázáno, že fluorescein jako záporně nabitá molekula se uvolňuje podstatně méně než akridinová oranž.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on releasing of the solubilized substances from the phase separated hydrogels. The aim of this work is to determine the solubilization capacity of these hydrogels. Preparation of them were based on interaction between hyaluronan and cationic surfactant carbethopendecinium bromide. Hydrogels were prepared by two possible ways, „wet“ and „dry way“. For solubilization experiments were used fluorescein and acridine orange as fluorescent probes. Primarily UV-VIS spectrophotometry was used to determine if these probes are released from hydrogel or not. Hydrogels were monitored after 24, 48 and 72 hours from their preparation. But this method proved to be inappropriate and inaccurate, because of cloudy supernatants over the hydrogels and also because of very low concentrations of fluorescent probe in this solution. For these reasons instead of this method was used method, which is based on fluorescence. The instrument is called MicroTime 200. It's very accurate method and results of this are considered like relevant. It was proved that fluorescein as a negatively charged molecule is released less than acridine orange.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, karbethopendecinium bromid, hydrogel, solubilizace, uvolňování, UV-VIS spektrofotometrie,

KEYWORDS

hyaluronan, carbethopendecinium bromide, hydrogel, solubilization, releasing, UV-VIS spectrophotometry

HAVLÍKOVÁ, M. *Uvolňování solubilizačních látek z fázově separovaných hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. s 65. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho trpělivost, vstřícnost, odborné vedení a cenný čas, který mi věnoval. Velké díky také patří Ing. Sabíně Jarábkové za její trpělivost, pomoc a rady při průběhu měření a čas, který mi věnovala při konzultacích. Dále bych také chtěla poděkovat rodině za její podporu při studiu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Gely.....	8
2.1.1. Vznik gelů.....	8
2.1.1.1. Kovalentně síťované gely	8
2.1.1.2. Fyzikálně síťované gely	9
2.1.1.3. Botnání gelů.....	10
2.1.2. Dělení gelů.....	10
2.1.3. Vlastnosti gelů	11
2.1.4. Využití	11
2.2. Hydrogely	11
2.2.1. Vlastnosti a využití hydrogelů	12
2.3. Polyelektrolyty.....	13
2.3.1. Hyaluronan (Hya).....	13
2.3.1.1. Vlastnosti a využití	15
2.4. Tenzidy	16
2.4.1. Micely.....	16
2.4.2. Septonex	17
2.4.3. Solubilizace	18
2.4.3.1. Fluorescenční sondy	18
2.4.3.2. Fluorescein (FLUO).....	19
2.4.3.3. Akridinová oranž (AO).....	19
2.5. UV-VIS spektrofotometrie.....	20
2.5.1. Instrumentace.....	22
2.6. Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	23
2.6.1. Instrumentace.....	23
2.7. Kinetika uvolňování.....	24
2.7.1. Vnější difúze.....	26
2.7.2. Vnitřní difúze.....	26
2.7.3. Desorpce	28
2.7.4. Chemické reakce.....	28

2.7.5.	Změny v hydrogelové matrice	28
3.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
3.1.	Interakce polyelektrolyt – tenzid	29
3.2.	Uvolňování z hydrogelů.....	31
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1.	Chemikálie	32
4.2.	Použité metody.....	32
4.2.1.	Příprava zásobních roztoků	32
4.2.2.	Příprava gelů.....	33
4.2.3.	Příprava kalibračních roztoků.....	33
4.2.4.	UV-VIS spektrofotometrie	34
4.2.5.	FCS – Systém MicroTime 200	34
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1.	Kalibrační křivky – UV-VIS spektrofotometrie	34
5.2.	Příprava hydrogelů.....	37
5.3.	Solubilizační kapacita hydrogelů – UV-VIS spektrofotometrie	41
5.4.	Kalibrační křivky – MicroTime 200	42
5.5.	Solubilizace kapacita hydrogelů – systém MicroTime 200.....	44
6.	ZÁVĚR.....	47
7.	LITERATURA.....	49
8.	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	53
8.1.	Seznam použitých zkratk	53
8.2.	Seznam použitých symbolů	53
9.	PŘÍLOHY.....	54
9.1.	Příprava kalibračních roztoků	54
9.2.	Kalibrační křivky – UV-VIS spektrofotometrie	54
9.3.	Příprava hydrogelů.....	55
9.4.	Solubilizační kapacita hydrogelů – UV-VIS spektrofotometrií.....	58
9.5.	Solubilizační kapacita hydrogelů – systém MicroTime 200.....	59

1. ÚVOD

Hydrogel je definován jako prostorová síť polymerních řetězců a vody, která vzniká v přítomnosti síťovacích činidel, čímž mohou být např. micely, a to kladně i záporně nabitě. V dnešní době zaujímají široké uplatnění v různých odvětvích. Využívají se k výrobě kontaktních čoček, v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, v tkáňovém inženýrství a dalších odvětvích. Hydrogely díky svým unikátním vlastnostem, jako je jejich nerozpustnost ve vodném prostředí, schopnost absorbovat velké množství vody, biokompatibilita a biodegradabilita v případě použití biopolymerů, jsou vhodným materiálem k využití jako nosiče léčiv pro jejich řízené uvolňování nebo také jako krycí materiál pro hojení ran. K těmto účelům je nutné znát nejen chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti daných hydrogelů, ale také matematicko-fyzikální model, který by popisoval uvolňování látek z těchto matic. Kinetika uvolňování závisí na geometrii a složení hydrogelu, na použitých látkách, které se mají uvolňovat, ale také na způsobu přípravy hydrogelů a na okolních podmínkách. Při uvolňování se také musí brát v úvahu fakt, že uvolněná látka může podléhat enzymatické degradaci, interakci s okolními bílkovinami a jinými molekulami přítomných v okolí. Z těchto důvodů se celý proces mechanismu uvolňování rozděluje na vnitřní a vnější difúzi, desorpci a chemické reakce.

Cílem této práce je popsat zadržovací schopnosti gelů na základě solubilizace a následného uvolňování použitých látek. K těmto účelům byl využit hydrogel na bázi hyaluronan-kationaktivní tenzid Septonex a jako solubilizovaná modelová látka byl použit záporně nabitý fluorescein a kladně nabitá akridinová oranž. Hydrogely byly připraveny dvěma způsoby, mokrou a suchou cestou. Zda se z hydrogelu něco uvolní, tedy jejich solubilizační kapacita, byla stanovena spektrofotometricky a následně také pomocí měření založeného na fluorescenci solubilizovaných látek na přístroji MicroTime 200.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Gely

Gely lze chápat jako disperzní systémy tvořené trojrozměrnou sítí, která vytváří souvislou strukturu, prostupující celým disperzním prostředím, které je spolu s disperzním podílem spojitě. [1]. Částice, které svým spojováním tvoří gely, bývají nejčastěji koloidního charakteru a jejich velikost se pohybuje řádově v nanometrech [2]. Tyto částice jsou spojovány vlivem fyzikálních nebo chemických sil (tvorba tzv. uzlů), díky nimž tvoří prostorovou síť. Podle těchto sil se gely mohou dělit na fyzikálně nebo kovalentně síťované [3]. Gely bývají také velmi často označovány jako *lyogely*, což je systém s kapalným disperzním prostředím. Pokud by toto prostředí bylo odstraněno, např. vysušením, vznikl by systém nazývaný *xerogel*, který by obsahoval jen disperzní podíl [1].

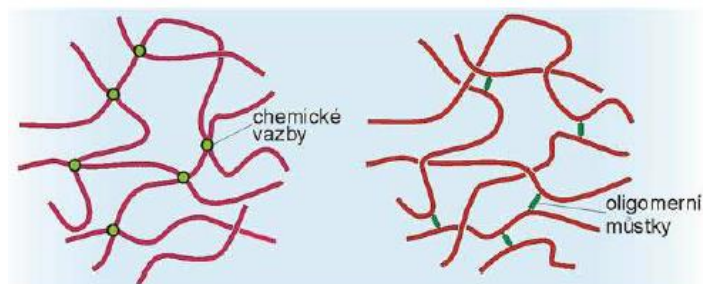
2.1.1. Vznik gelů

Proces vzniku gelu nazýváme obecně *gelace*, při které dochází ke spojování molekul lineárního polymeru a jeho roztoku, čímž se vytvoří dostatečné množství spojů, až vzniká prostorová síť. Molekuly mezi sebou mohou být navzájem propojeny fyzikálně nebo chemicky. Fyzikální gely vznikají na základě fyzikálních interakcí mezi řetězci, jako jsou např. vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce aj. Těmto gelům se také říká *fyzikálně síťované*. Chemické gely vznikají zesíťováním kovalentními vazbami, které jsou mnohem pevnější a odolnější než fyzikální. Takto vzniklým gelům se říká kovalentně síťované [4].

Na průběh gelace má značný vliv teplota. Zvýšená teplota je nežádoucí, kdy dochází k růstu intenzity tepelného pohybu jednotlivých segmentů a klesá tak počet vazeb mezi makromolekulami i doba jejich trvání. Dalším faktorem, který ovlivňuje průběh gelace, je koncentrace. Zde platí, že vzrůst koncentrace napomáhá k tvorbě gelů, protože tak vzrůstá četnost srážek makromolekul, čímž se zvyšuje počet vazeb. Značný vliv má i pH, kdy gelace probíhá nejlépe při hodnotě pH, která odpovídá izoelektrickému bodu [1].

2.1.1.1. Kovalentně síťované gely

Kovalentně síťovaný gel představuje nekonečnou trojrozměrnou síťovitou strukturu, která je tvořena kovalentními vazbami (Obr. 1). Mohou vznikat nelineární kondenzační nebo adiční polymerací monomerů nebo z lineárních polymerů za přítomnosti vhodného síťovacího činidla. Jejich struktura je velmi pevná a nelze je převést zpět do roztoku, protože by muselo dojít k odbourání pevných chemických vazeb, přičemž by se mohli odbourat i ty vazby, které gelaci nevznikly [1].



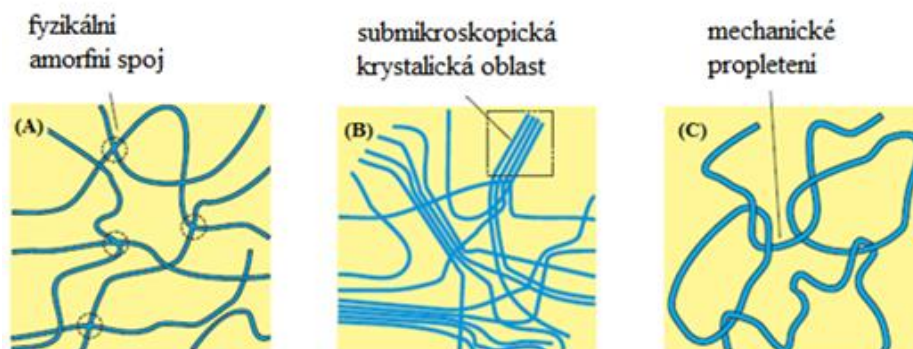
Obr. 1: Kovalentně síťované gely [1]

2.1.1.2. Fyzikálně síťované gely

Za působení fyzikálních sil, jako jsou např. vodíkové vazby, Van der Waalsovy síly aj., dochází ke spojování polymerních řetězců, které plní funkci tzv. uzlů, za vzniku fyzikálně síťovaných gelů. Vzniklé uzly se tvoří mezi libovolnými úseky makromolekul a jedna makromolekula může být zapojena do několika uzlových oblastí. Takto zapojené části se střídají s volnými úseky, které si zachovávají ohebnost a tepelný pohyb [1]. Vzniklé spoje jsou mnohem větší než u kovalentních gelů, proto se častěji používá označení jako uzlové oblasti, která se mohou lišit historií vzniku, velikostí, strukturou, pevností a dobou života. Fyzikální uzly mohou zanikat a v jiném uspořádání zase vznikat. Také se mohou rozpadat při mechanickém namáhání gelu. Jedná se o tzv. tixotropii, která je blíže popsána v kapitole 2.1.3 [4].

Velký vliv na vlastnosti vzniklých gelů má pevnost a doba trvání těchto spojů. Pokud se jedná o pevné spoje, tak se gely chovají podobně jako gely kovalentně síťované. Gely se slabými uzly se rozpadají vlivem větších napětí, zvýšením teploty aj. Pokud lze gel převést na roztok ohřátím a zpět na gel ochlazením roztoku, jedná se o tzv. termoreverzibilní gely. Teplota, při které gel přechází na sol, se nazývá *teplota ztekucení* a teplota, při které koloidní roztok tuhne v gel, *teplota tuhnutí*. Přechod z roztoku na gel je proces postupný, kdy sol přechází přes viskózní a polotuhá stádia na gel. Proto teploty ztekucení a tuhnutí nejsou stejné, ale liší se většinou o 10 až 20 °C. To závisí na rychlosti chlazení nebo ohřívání, ale také na stárnutí gelu. Rozdíl teplot je dán tím, že při ochlazování solu vznikají nejdříve málo pevné vazby a jejich pevnost postupně roste, takže se styčné body tvoří při nižší teplotě, než při které se rozpadají [1].

Fyzikální uzly mohou vznikat asociací mezi jednotlivými řetězci při snížení afinity vysokomolekulární látky k rozpouštědлу (např. snížení teploty, zvýšení koncentrace apod.). Pokud je asociace makromolekul nepravidelná, vznikají tzv. amorfní gely (Obr. 2A). Dále mohou vznikat gely, ve kterých se střídá oblast s krystalickou strukturou (krystalita) s amorfní oblastí (Obr. 2B). K tomu dochází, když se ukládají poměrně krátké úseky lineárních makromolekul rovnoběžně a vzniká krystalická mřížka. Také může docházet ke tvorbě gelů geometrickým síťováním, mechanickým propletením řetězců v důsledku tepelného pohybu (Obr. 2C) [2]. Tato propletení bývají ale krátkodobá a po určité době se řetězce rozpletou a vzdálí [1].



Obr. 2: Fyzikálně síťované gely: A) s fyzikálními amorfními spoji, B) s fyzikálními spoji s krystalickými oblastmi, C) s geometrickým síťováním [2]

2.1.1.3. Botnání gelů

Reverzibilní gely mohou vznikat tzv. botnáním. Jedná se o proces, při kterém xerogel pohltí nízkomolekulární rozpouštědlo a tím nabývá na objemu a zvětšuje svoji hmotnost. Takto vzniká lyogel [1].

Rozlišujeme botnání omezené a neomezené. Při *omezeném botnání* dochází k pohlcování kapaliny xerogelem, které se zastaví ve stádiu elastického lyogelu. Další kapalina už není pohlcována, ani v případě jejího přebytku. Omezené botnání může nastat v případě, kdy je polymer s daným rozpouštědlem omezeně mísitelný a vznikají tak dvě fáze, nabotnalý gel (nasycený roztok rozpouštědla v polymeru) a velmi zředěný roztok až téměř čisté rozpouštědlo (nasycený roztok polymeru v rozpouštědle). Nebo může omezené botnání nastat u kovalentně síťovaných gelů, kdy kovalentní vazby brání odpoutání jednotlivých makromolekul a jejich přechodu do roztoku. *Neomezeným botnáním* se rozumí pohlcování kapaliny xerogelem, které se nezastaví ve stádiu lyogelu. Za přítomnosti dostatečně velkého množství rozpouštědla zanikají spoje (do určitého stupně nabotnání) a jednotlivé makromolekuly přecházejí do roztoku. Přídavkem dalšího rozpouštědla by došlo k naředění. Takto vznikají fyzikálně síťované gely [1].

2.1.2. Dělení gelů

Nejčastěji se gely dělí podle chování ve vysušeném stavu, a to na gely reverzibilní a ireverzibilní. *Reverzibilní gely* při vysoušení zmenšují svůj objem až dojde k úplnému odstranění disperzního prostředí a vzniká xerogel. Tento gel je schopen přejít zpět do původního stavu (lyogelu), a to přijmutím disperzního prostředí, kdy dojde k jeho nabotnání [1]. Reverzibilní gely mohou tedy vznikat z xerogelů procesem bobtnání nebo gelací z roztoků vysokomolekulárních látek. Podle povahy sil, které drží síťovou strukturu pohromadě, se reverzibilní gely dělí na *fyzikálně síťované* a *kovalentně síťované gely* [2]. Naopak *gely ireverzibilní* mají ve vysušeném stavu přibližně stejný objem jako původní lyogel, s tím rozdílem, že jsou porézní. Při styku vysušeného xerogelu s disperzním prostředím jsou schopné pohltit jen malé množství a lyogel tak nazpět nevzniká. Přeměna lyogelu na xerogel je tedy nevratný proces [1].

Gely lze také dělit podle chemického složení disperzního podílu, a to na *anorganické* a *organické*. Podle disperzního prostředí na *hydrogely*, které mají vodné disperzní prostředí, a *organogely*, jejichž disperzní prostředí tvoří organická kapalina. Pokud je jejich disperzní prostředí tvořeno monomerm disperzního podílu, hovoříme o tzv. *izogelech* [1].

2.1.3. Vlastnosti gelů

I přes to, že disperzní prostředí gelů je kapalné, mají *mechanické vlastnosti*, které jsou charakteristické pro tuhý stav [3]. A to i takové gely, které obsahují až 99,9 hm. % kapaliny. Celkově lze jejich chování popsat jako viskoelastické. Gely jsou schopné odolávat tečnému napětí do určité hodnoty, pod kterou se chová jako elastické tuhé těleso. Ta závisí jak na koncentraci uzlů, tak na jejich pevnosti. Značnou elasticitu vykazují gely chemicky síťované, kde platí, že čím více je vazeb mezi řetězcem polymeru, tím menší je možnost změny tvaru makromolekuly, prostorová síť je rigidnější a elasticita je nižší. Fyzikálně síťované gely vykazují tzv. *tixotropii*. Jsou schopny mechanickými účinky (např. protřepání) přejít z gelu zpět na sol. To je dáno tím, že fyzikální síly, které drží prostorovou síť pohromadě, jsou poměrně slabé. Pokud ale necháme ztekucený sol stát v klidu, dojde k obnově vazeb a nové gelaci [1].

Mezi další vlastnosti patří *elektrická vodivost*, která je téměř stejná jako v solu. V disperzním prostředí se malé molekuly a ionty rozpuštěných látek pohybují stejně rychle jako v solu. To stejné platí pro *difuzivitu*, která je taktéž téměř neměnná. U čerstvých gelů, které nejsou v termodynamické rovnováze, probíhají samovolné procesy, jako je např. *stárnutí* (synerze). Při tomto ději roste počet styčných bodů a dochází ke smršťování struktury, čímž dojde k vytlačení disperzní kapaliny. Stárnutí může být podpořeno zvýšením teploty [1].

2.1.4. Využití

Gely mají poměrně široké využití. Velký význam mají v lékařství, biologii a ve farmacii, kde se proces gelace využívá k přípravě gelových kapslí. Dále také v potravinářství a v pekařském průmyslu, kde je řada procesů založena právě na tvorbě gelů. Proces gelace je také důležitý při řadě technických procesů, jako je např. výroba vláken, zpracování kůží, aplikace lepidel a další [2].

2.2. Hydrogely

Jedná se o trojrozměrnou síťovitou strukturu získanou z přírodních nebo syntetických polymerů, která je schopna absorbovat velké množství vody, aniž by se rozpouštěly. Absorpce vody souvisí s přítomností hydrofilních funkčních skupin, které se nachází na polymerním řetězci. Mezi tyto funkční skupiny patří např. karboxylové ($-\text{COOH}$), hydroxylové ($-\text{OH}$), amidové ($-\text{CONH}_2$) aj. [5]. Polymer tedy plní funkci matrice, která drží vodu pohromadě. Voda uvnitř hydrogelu pak umožňuje volnou difúzi rozpuštěných molekul [6]. V hydrogelech se voda nachází ve třech podobách. *Volná (dodatková) voda*, která se nachází ve vnější vrstvě a lze ji poměrně snadno odstranit. K adsorpci vody dojde na základě osmotické síly, která způsobuje rozšiřování pórů a dutin v hydrogelu. Nejdříve

dochází k hydrataci polárních hydrofilních skupin. Takto absorbovaná voda se nazývá *primárně vázaná* a je ji poměrně obtížné odstranit ze struktury. Tímto dochází ke vzniku interakcí, jako jsou vodíkové můstky a iontové interakce. Také dochází k zvětšení celé sítě a k odkrytí hydrofobních skupin. Tyto skupiny interagují s molekulami vody a váže se tzv. *sekundárně vázaná* voda. Primárně a sekundárně vázanou vodu lze souhrnně označit jako celkově vázaná [7].

Hydrogely lze dělit podle několika kritérií, jako je způsob přípravy, povahy zesíťování, rychlosti biodegradace a další [5]. Obecně je lze ale rozdělit na fyzikální a chemické. *Fyzikální hydrogely* jsou zesíťovány pomocí slabých fyzikálních interakcí. Jsou také známy jako gely termoplastické nebo dočasné. *Chemické hydrogely* jsou zesíťovány pomocí silnějších kovalentních interakcí, díky nimž jsou podstatně stabilnější než hydrogely fyzikální [7]. Chemicky síťované jsou také někdy známé jako hydrogely reaktoplastů nebo gely trvalé, protože je nelze rozpustit v žádném typu rozpouštědla [5].

2.2.1. Vlastnosti a využití hydrogelů

Hydrogely se vyznačují vlastnostmi, které jsou typické jak pro kapaliny, tak pro tuhé látky [6]. Důležitou vlastností je jejich biokompatibilita, biodegradabilita a s tím související netoxičita, a to zejména u hydrogelů, které jsou připraveny z přírodních polymerů. Takovéto hydrogely nacházejí uplatnění v medicíně a farmacii. K jejich přípravě se velmi často využívá jako síťovací polymer kyselina hyaluronová [7]. Další důležité vlastnosti jsou např. dobrá propustnost pro kyslík, nízká adsorpce proteinů, minimální třecí poškození v okolních tkáních po implantaci, snadné povrchové úpravy, schopnost absorbovat velké množství vody, nerozpustnost ve vodném prostředí atd. [7, 8]. Velmi užitečnou vlastností je jejich schopnost gelace při teplotě okolí, nepotřebují tedy žádné extrémní podmínky. Hydrogely se všemi těmito vlastnostmi jsou vhodné biomateriály pro použití jako nosiče léčiv, krytí ran, pro zapouzdření buněk, pro výrobu kontaktních čoček, v tkáňovém inženýrství, jako biosenzory, náhrada měkkých tkání aj. [5]. K účelům distribuce léčiv se využívají hydrogely z přírodních polymerů, které sice nemají dostatečné mechanické vlastnosti a mohou obsahovat i nějaké kontaminanty, které se musí pracněji odstraňovat, ale jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Naopak syntetické polymery sice nedisponují přirozenou biokompatibilitou a biodegradabilitou, ale obvykle mají přesně definovanou strukturu, která může být upravena tak, aby se tyto vlastnosti zlepšily [8].

Pro většinu biomedicínských aplikací je vhodnější tzv. biodegradabilní hydrogel. Jsou schopné degradovat i při mírných podmínkách okolí. Ve srovnání s hydrogely, které nejsou rozložitelné, by se eliminoval další chirurgický zásah k obnově implantovaného gelu. Další možností jsou „inteligentní“ hydrogely. Jedná se o polymerní matrice, které jsou citlivé na okolní prostředí a na podněty z něj. Např. mohou reagovat na pH či teplotu a mohou tak zvýšit nebo snížit stupeň botnání. U neiontových hydrogelů nedochází k žádné reakci při změně pH, stupeň botnání závisí na chemické struktuře polymeru. U aniontových hydrogelů dochází k deprotonaci a ke zvýšení botnání v případě, kdy je pH vnějšího okolí vyšší než pKa ionizovatelných skupin na polymeru. U kationtových hydrogelů je to opačné [9].

2.3. Polyelektrolyty

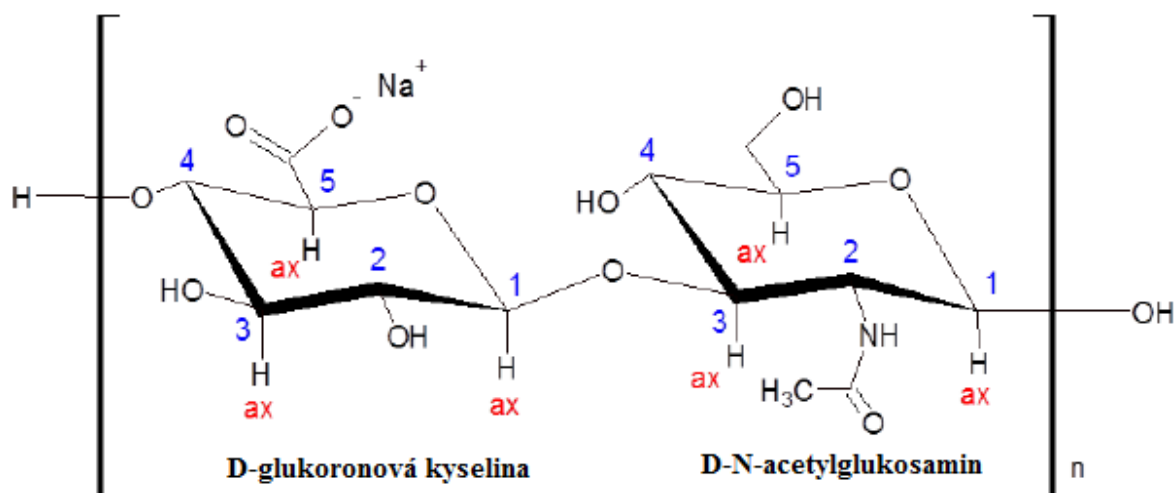
Polyelektrolyty se řadí mezi polymery a lze je nazvat jako roztoky vysokomolekulární látky obsahující funkční skupiny, které jsou schopné ionizovat ve vhodném rozpouštědle a vytvářet v roztoku ionty. Nesou tak elektrický náboj, který je získáný disociací v polárních rozpouštědlech. Polyelektrolyty můžeme rozdělit podle povahy skupin, které jsou schopné disociace, a to na polyelektrolyty obsahující kyselou ($-\text{COOH}$), bazickou skupinu ($-\text{NH}_2$) nebo obě zároveň, tzv. amfoterní polyelektrolyty. Pokud disociuje polyelektrolyt s kyselou skupinou, bude mít výsledný náboj záporný, naopak s bazickou skupinou bude mít náboj kladný. U amfoterních náboj závisí na pH prostředí [3]. Disociací tak vzniká tzv. makroion (jeho povaha závisí na ionizovatelných skupinách a pak rozeznáváme makroanion a makrokation) a ekvivalentní počet malých iontů opačného náboje (protiion) [4]. Chování polyelektrolytů závisí na jejich koncentraci, na kvalitě rozpouštědla, hustotě náboje na řetězci, přítomnosti dalších látek (např. nízkomolekulární soli) aj [10]. Významné jsou biologické polyelektrolyty, kam se např. řadí amfoterní proteiny a nukleové kyseliny [4].

2.3.1. Hyaluronan (Hya)

Kyselina hyaluronová (HA) byla objevena roku 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem, kteří publikovali článek v časopise *Journal of Biological Chemistry* o neobvyklém polysacharidu s extrémně vysokou molekulární hmotností. Izolovali ji extrakcí vodou a acetonem z očního sklivce skotu. Tito pánové se považují za objevitele HA. V průběhu 10 let byla HA izolována z různých zvířecích orgánů a tkání, např. ze synoviální tekutiny, pupeční šňůry aj. Roku 1937 byla provedena extrakce HA ze skupiny A a C hemolytických streptokoků. Tato práce měla jak vědecký, tak praktický význam, protože streptokoky jsou dnes nejekonomičtějším a spolehlivým zdrojem pro průmyslovou výrobu HA. Roku 1949 C. Regan a K. Mayer popsali chování hyaluronanu v revmatoidní synoviální tekutině a téhož roku byla objevena extrakce HA z kohoutích hřebínků. První publikace o struktuře byla roku 1951 A. G. Ogstonem a J. E. Stanierem. V následujících letech byly prohloubeny znalosti o struktuře, ale také byly popsány další metody, které využívají různé druhy extrakce, enzymatické hydrolýzy, frakcionace atd. [11].

Ve vodném roztoku se HA nevyskytuje ve formě kyseliny, ale v disociované formě sodné nebo draselné soli. Chová se tedy jako polyelektrolyt, který je znám pod názvem hyaluronan. Řadí se do skupiny glykosaminoglykanů. Jedná se o striktně lineární řetězec, který se skládá z disacharidových podjednotek. Tyto podjednotky jsou složeny z D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu, které jsou k sobě střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou (Obr. 3). Tyto vazby jsou navíc stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky [12]. Glukóza v konfiguraci β je základem disacharidové jednotky a dovoluje prostorově objemnějším skupinám zaujmout ekvatoriální polohu, která je stericky výhodnější. Naopak malé molekuly vodíku obsazují méně stericky výhodné axiální polohy, které v molekule tvoří hydrofobní oblasti („hydrophobic patch“). Hyaluronan tedy má jak hydrofilní, tak hydrofobní oblast a jedná se o amfifilní molekulu. Primární struktura je energeticky velmi stabilní. Sekundární struktura je dvakrát stočená šroubovice, kde každá

jednotka disacharidu je stočena o 180° (nejedná se o dvoušroubovici, ve které by byly zapojeny dva řetězce). [13]



Obr. 3: Struktura molekuly HYA složená z D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu

Ve fyziologickém roztoku se hyaluronan jeví jako viskózní látka. To je z toho důvodu, že celá molekula je zpevněna vazbami disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a ještě navíc interakcemi s okolním rozpouštědlem, kdy se shlukují hydrofobní oblasti, aby nedošlo k jejich kontaktu s polárním prostředím. Hyaluronan pak tvoří tzv. doménové struktury [13]. Ve struktuře se nachází poměrně velké množství skupin -OH, díky nimž je hyaluronan silně hygroskopická látka schopna pojmout až tisícinásobek hmotnosti vody [14].

Jelikož se řetězce hyaluronanu mohou lišit svou délkou, mají i různou molekulovou hmotnost. Lze se tak setkat s nízko i vysokomolekulárním hyaluronanem. V molekule se může nacházet až 10 000 disacharidových jednotek, přičemž jedna jednotka má přibližně hmotnost 400 Da. Pak tedy můžeme dostat molekulovou hmotnost až $4 \cdot 10^6$ Da [12].

V současné době existují dva možné způsoby průmyslové výroby HA. Prvním je extrakce z živočišných druhů (např. oční sklívec skotu, kohoutí hřebínky, pupeční šňůra). Tento způsob výroby je ale poměrně nákladný a časově náročný. Takto získaný hyaluronan často obsahuje různé kontaminanty (proteiny, nukleové kyseliny, bakteriální endotoxiny atd.), které musí být odstraněny. Z těchto důvodů je tento způsob nahrazen bakteriální produkcí. Hyaluronan jsou schopny produkovat streptokoky skupiny A a C. [15].

Metabolismus hyaluronanu v organismu je velmi dynamický. Pro udržení stálé koncentrace je potřeba vyvážený poměr syntézy a degradace. V organismech savců je syntéza katalyzována skupinou enzymů hyaluronansyntázy a probíhá v plasmatické membráně buňky [15]. Enzymy střídavě vážou jednotlivé monosacharidy příslušnými vazbami a výsledná molekula je pak vytlačena do extracelulární matrix, kde je schopna se vázat s dalšími látkami a tvořit tak různé komplexy [12]. Samotná syntéza je pro buňku poměrně energeticky náročný proces [16].

Degradace hyaluronanu probíhá za katalýzy 3 typů enzymů. Hyaluronidáza štěpí HA na menší oligosacharidy, β -D-glukuronidáza a β -N-acetyl-hexosaminidáza dále degradují tyto oligosacharidy od neredukujícího konce.

2.3.1.1. Vlastnosti a využití

Hyaluronan nachází uplatnění v biomedicínských aplikacích hlavně díky jeho jedinečné kombinaci vlastností, mezi které patří vysoká hygroskopičnost, viskoelastická povaha, biokompatibilita a biodegradabilita. Výhodou je, že HA má ve všech tkáních a ve všech organismech stejnou strukturu, proto nezpůsobí reakci imunitního systému, není tedy imunogenní. [15].

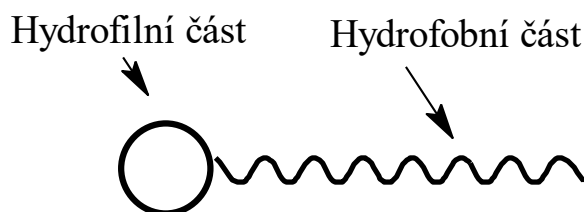
Hyaluronan se využívá k léčbě osteoartrózy, neboť je součástí synoviální tekutiny v kloubech. Také má využití v kosmetice, kde je součástí různých přípravků na pleť, které mají sloužit k hydrataci a vyhlazování vrásek [15]. V oftalmologii našel uplatnění při operaci šedého zákalu, protože je přirozenou součástí očního sklivce. Také se přidává do umělých slz, které se používají při syndromu suchého oka [17]. V posledních 20 letech se výzkum ubírá směrem využití hyaluronanu k cílené distribuci léčiv. Existují už komerčně dostupné přípravky různých derivátů a zesíťovaných materiálů Hya, které se mohou nacházet ve formě různých filmů, mikrokuliček, vláken, hydrogelů a dalších [16]. Cílená distribuce léčiv je založena na podávání léčiva ve vysoké koncentraci, které je slabě vázané na makromolekulární nosič, k cílenému místu (např. nádor). V případě nádoru by pak docházelo k poškození pouze nádorových buněk, nikoliv i buněk zdravých jako je tomu u cytostatik [18].

Hya má své uplatnění díky své hydrofilitě pro aplikace, kde je nutná minimální buněčná adheze. Vlivem této adheze, např. u pooperačních ran, může docházet k přemostění, což pak způsobuje poškození tkání, různé srůsty a jizvy [16]. Zesíťovaný hyaluronan se využívá jako antiadhezivní bariéra, která díky své viskozitě přilne k povrchu tkáně a zajistí tak separaci dvou přiléhajících tkání po dobu fáze hojení. Tím by měla být eliminována tvorba pooperačních srůstů [19]. Důležité uplatnění má Hya při hojení ran. Během poranění tkáně dochází k poškození extracelulární matrix (ECM) mechanicky i bakteriálně. Tím dojde k naštěpení Hya na krátké fragmenty o nízké molekulové hmotnosti (signální molekuly), které aktivují imunitní systém, a může dojít k zánětu. Současně se ale aktivují buňky, které jsou zodpovědné za regeneraci Hya. Ten v místě poranění tvoří vlhké prostředí, ve kterém je podporována syntéza dalších složek pojivové tkáně a množení buněk. Syntetizovaný vysokomolekulární Hya je zodpovědný za správnou organizaci a orientaci kolagenových vláken a mikrofibril, dále je také schopná interagovat s buněčnými receptory, čímž může začleňovat buňky do ECM a podílet se na migraci buněk. Jak už bylo zmíněno, hydratuje ECM, což usnadňuje volný průchod živin a kyslíku. Exogenně dodávaný hyaluronan přitahuje z rány tzv. exudát. Jedná se o tekutinu z rány, která obsahuje odumřelé buňky, ale také růstové a výživové faktory z živých buněk, které mají pozitivní vliv na celý proces hojení. Zároveň z okolní tkáně snižuje koncentraci TGF proteinu, který je zodpovědný za vazivové zjizvení tkáně [20].

2.4. Tenzidy

Tenzidy jsou organické látky, které mají schopnost hromadit se na fázovém rozhraní i při nízkých koncentracích nebo se adsorbovat a snižovat tak povrchové napětí mezi fázemi. Někdy jsou též označovány jako povrchově aktivní látky [21]. Jako rozhraní rozumíme hranici mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Hnací silou tenzidů je snižování energie na fázovém rozhraní [22].

Jedná se o tzv. amfifilní látku, jejíž molekula je tvořena dvěma částmi. Hydrofilní část (polární hlava) je tvořena výrazně hydrofilní skupinou (např. karboxylová skupina $-\text{COOH}$, sulfonová skupina $-\text{SO}_3\text{H}$ atd.) a z části hydrofobní (nepolární ocas), která je nejčastěji tvořena nasyceným uhlovodíkovým řetězcem (Obr. 4) [23]. Toto označení platí v případě, kdy rozpouštědlem je voda. Obecně rozdělujeme tenzid na část rozpustnou v daném rozpouštědle (lyofilní) a nerozpustnou (lyofobní) [22]. Pro lepší rozpustnost tenzidů ve vodě se často využívají sodné či draselné soli, které vznikají substitucí atomu vodíku v polární části za atomy sodíku nebo draslíku (např. $-\text{COONa}$, $-\text{SO}_3\text{K}$ atd.) [23].



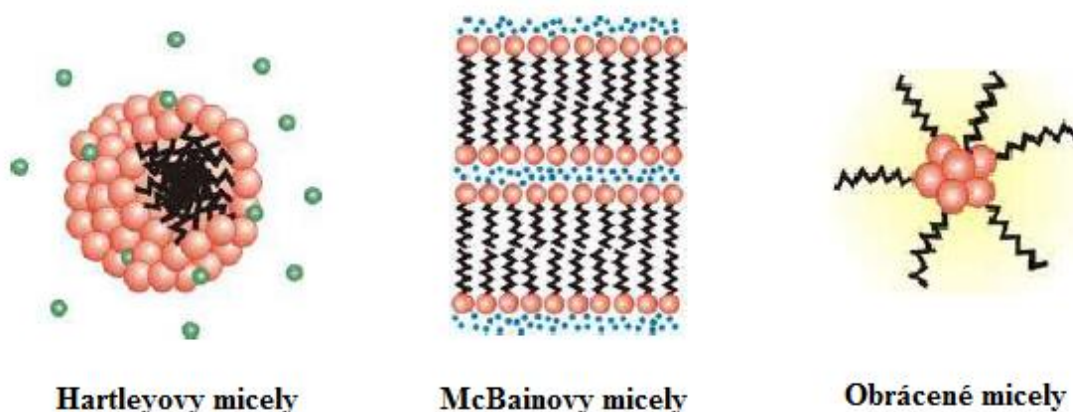
Obr. 4: Obecné schéma molekuly tenzidu

2.4.1. Micely

Další vlastností tenzidů je tvorba agregátů, tzv. micel, při koncentraci, která se označuje jako kritická micelární koncentrace (CMC). Tvorba micel může být ovlivněna délkou a strukturou uhlovodíkového řetězce tenzidu, kdy s rostoucím řetězcem hodnota CMC klesá. Dále má na tvorbu micel vliv hydrofilní skupina, protiionty, příměsi dalších látek v roztoku, přítomnost neelektrolytů, vliv teploty a tlaku aj [1].

Ve vodném prostředí je jádro micely tvořeno navzájem propletenými uhlovodíkovými řetězci molekul tenzidů. Polární skupiny tenzidů jsou pak rozmístěny ve vnějším povrchu micely. Tímto uspořádáním je dosaženo minimálního styku hydrofobní části molekuly s molekulami vody v okolí. Pokud jde o ionogenní tenzidy, tak jejich polární skupiny disociují a vznikají tak nabitě micely, které jsou obklopené elektrickou dvojvrstvou tvořenou disociací vzniklými protiionty. Ovšem velikost i tvar micel je různý a závisí na koncentraci, teplotě a molekulární struktuře tenzidů. Existují tzv. Hartleyovy micely. Jedná se o malé kulovité agregáty molekul tenzidů, jejichž uhlovodíkové řetězce jsou navzájem propleteny a tvoří tak jádro micely. Polární skupiny pak směřují směrem ven do vody. Takovéto micely vznikají ve zředěných vodných roztocích. U koncentrovanějších roztoků mají micely i jiný tvar než kulovité. S rostoucí koncentrací roztoku roste rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se v nich orientují navzájem více rovnoběžně, kulovité micely se tak postupně mění ve válcovité útvary, až vznikají laminární micely, též známé jako McBainovy. Ty jsou složeny ze

dvou vrstev tenzidů, které jsou k sobě obrácené uhlovodíkovými řetězci a ionogenní skupiny směřují směrem ven. V nevodném prostředí mohou vznikat obrácené micely. Jádrem těchto micel je tvořeno polárními skupinami, uhlovodíkové řetězce směřují směrem ven do nepochopitelného prostředí. Různé tvary micel jsou znázorněny na Obr. 5 [1].

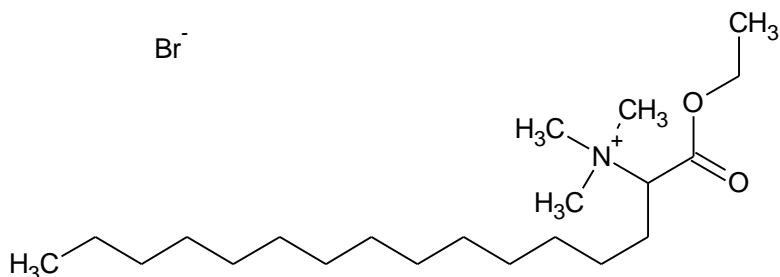


Obr. 5: Různé tvary micel ve vodném (Hartleovy a McMainovy micely) a nevodném (obrácené micely) prostředí [1]

2.4.2. Septonex

Septonex, jiným názvem také karbethodendecinium bromid, je kvartérní amoniová sůl [24]. Její hydrofobní část je tvořena delším uhlikaým řetězcem a hydrofilní hlava kvartérním aminem (Obr. 6), jehož náboj ve vodném prostředí je kladný. Řadí se tak mezi kationtové tenzidy.

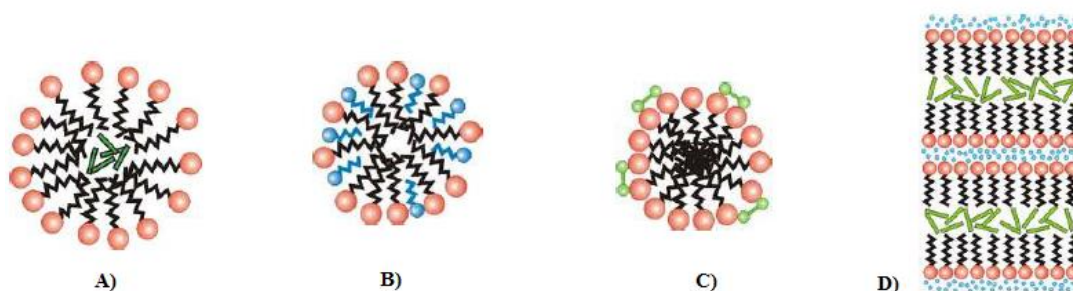
Jedná se o bílý až nažloutlý krystalický prášek, který je vysoce rozpustný ve vodě i organických rozpouštědlech (např. ethanol, chloroform). Vodný roztok Septonexu poměrně silně pění. Septonex se využívá pro jeho antiseptické a dezinfekční účinky v různých farmaceutických výrobcích, jako jsou oční kapky (Ophtalmo-Septonex), zasypy a masti na poraněnou kůži aj. [24]. Baktericidní vlastnosti má díky tomu, že vyvolává změny v permeabilitě buněčné membrány bakterií. Silněji působí na gram-pozitivní bakterie, ale jsou i bakterie, které zůstávají na Septonex rezistentní (např. druhy *Pseudomonas* a *Mykobakterium tuberculosis*). Septonex je také neúčinný na bakteriální spóry [25].



Obr. 6: Strukturní vzorec Septonexu

2.4.3. Solubilizace

Se stavbou micel souvisí tzv. solubilizace. Jedná se o schopnost rozpouštět i látky, které jsou v daném rozpouštědle nerozpustné nebo jen málo rozpustné. Mechanismus může být různý. Nepochopitelné látky se mohou rozpouštět v jádru micely (Obr. 7A). Polárně-nepochopitelné organické látky (alkoholy, aminy) se v micelách rozmisťují tak, že uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micely a polární skupiny směřují směrem ven (Obr. 7B). Polární látky se solubilizují na povrch micely nebo v těsné blízkosti povrchu (Obr. 7C). V laminárních micelách vstupuje organická látka do micely a rozmisťují se mezi uhlovodíkovými konci molekul. Tím dochází k oddalování vrstev molekulových řetězců (Obr. 7D) [1].



Obr. 7: Různé mechanismy solubilizace: A) začlenění do jádra, B) začlenění mezi jednotlivé tenzidy, C) solubilizace na povrch, D) začlenění mezi uhlovodíkové konce molekul v laminárních micelách [1]

Solubilizace má praktický význam při tzv. detergentci (praní znečištěných povrchů působením tenzidů). Ze zředěného vodného roztoku se nejdříve molekuly tenzidů adsorbují na povrch pevné látky a olejovité vrstvy (s dalšími nečistotami přilíná na povrch pevné látky). Tím se změní velikost smáčecího úhlu a olejovitá vrstva spolu s nečistotami se postupně sbaluje a uvolňuje do roztoku, kde dojde k jejich solubilizaci micelami. Povrch solubilizované nečistoty má pak hydrofobní charakter a nemůže se zpět připoutat k čistému povrchu pevné látky [1]. Detergenty pak rozumíme směs tenzidů a dalších látek, který má detergentní vlastnosti [21]. Solubilizace nachází také uplatnění v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, ve výrobě herbicidů a další [1].

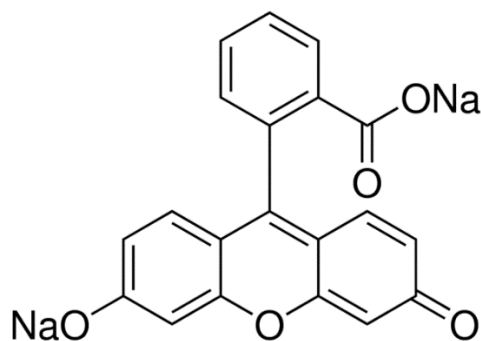
2.4.3.1. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy (fluorofory) jsou nejčastěji organické látky schopné fluorescence, které lze rozdělit do tří základních skupin [26]. *Vnitřní (vlastní)* fluorescenční sondy se vyskytují přirozeně a řadí se sem např. proteiny (aromatické aminokyseliny jako tryptofan, tyrozin a fenylalanin), NADH (jeho oxidovaná forma NAD^+ nefluoreskuje), NADPH, vitamín A, další [27]. Druhou skupinou jsou fluorescenční sondy *vázané kovalentně* k dané látce, ke které jsou přidávány. Takovéto látky se využívají např. ke značení proteinů, kde se kovalentní vazba může tvořit na aminoskupinách [26]. Někdy je tato skupina též označována jako fluorescenční značky [27]. Poslední skupinou jsou sondy *vázané nekovalentně*. Často při této vazbě mění své fluorescenční vlastnosti a jejich volba je velmi klíčová, protože právě díky jejich vlastnostem mohou umožnit získat potřebné informace. Solubilizace těchto sond je dána na základě jejich chemické povahy a struktury. Sondy mohou mít charakter hydrofilní

(pyranin), hydrofobní (pyren) i amfifilní [26]. U většiny těchto sond nedochází ke změně kvantového výtěžku fluorescence při vazbě na daný systém (např. fluorescein, akridinová oranž). Někdy je skupina kovalentně a nekovalentně vázaných sond souhrnně označována jako fluorescenční sondy vnější (nevlastní) [27].

2.4.3.2. *Fluorescein (FLUO)*

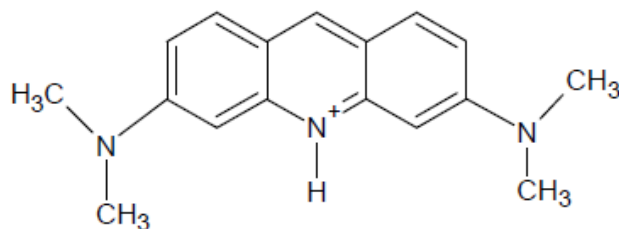
Fluorescein (2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanten-9-yl)benzoová kyselina) je komerčně dostupný ve formě různých derivátů, jako je např. fluorescein isothiokyanát či disodná sůl fluoresceinu (Obr. 8). Ve vodném prostředí se tak může nacházet v kationtové, neutrální, aniontové a dianiontové formě. To pak jeho absorpční a fluorescenční vlastnosti silně závisí na pH [28]. Fluorescein je hojně využíváný pro biologické a biochemické výzkumy, a to zejména díky jeho vlastnostem, jako je vysoká absorpční schopnost, vysoký kvantový výtěžek, dobrá rozpustnost ve vodě a alkoholech. [29]. Absorpční maximum je 490 nm a jeho emisní maximum ve vodném prostředí a fyziologickém pH je 521 nm [30]. Jedná se o červený krystalický prášek s poměrně vysokým bodem tání (320 °C).



Obr. 8: Strukturní vzorec sodné soli fluoresceinu

2.4.3.3. *Akridinová oranž (AO)*

Akridinová oranž (3,6-bis(dimethylamino)akridin) (Obr. 9) se velmi často využívá ke stanovení nukleových kyselin (DNA i RNA). Jedná se o kationaktivní fluorescenční sondu, dobře rozpustnou ve vodě. Absorpční maximum zředěné AO se nachází při vlnové délce 492 nm a spadá do tzv. α pásu. Se zvyšující se koncentrací se maximum objeví při 465 nm v β pásu a posouvá se dále směrem k 450 nm v γ pásu [31]. Maximum při 492 nm odpovídá monomeru AO, dimer excituje při vlnové délce 465 nm. Emisní maximum monomeru se nachází při 521 nm a dimeru při 650 nm [32]. Tvorba dimeru probíhá při vyšších koncentracích, kdy dochází k agregaci monomeru. Dimer je pak tvořen dvěma monomery AO, která je vůči monomeru pootočen o 48°. U dimeru pak velmi často dochází k samozhášení [33].



Obr. 9: Strukturní vzorec AO

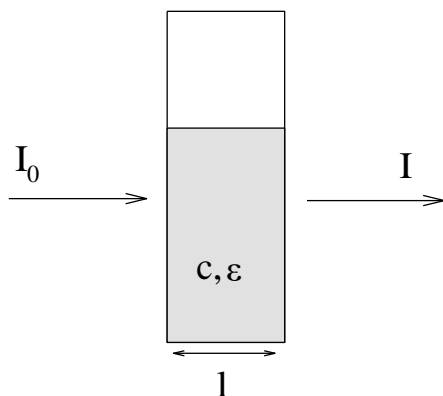
2.5. UV-VIS spektrofotometrie

Ultrafialová a viditelná spektrofotometrie se řadí mezi optické spektrální metody, při kterých dochází při interakci vzorku s elektromagnetickým zářením k výměně energie. Spektrum je závislost veličiny, která je mírou intenzity záření vysílaného nebo prošlého vzorkem (v tomto případě absorbance), na vlnové délce. Dále se řadí mezi metody absorpční, kde se sleduje pohlcování (absorpce) záření vzorkem. Využívá se vlnová délka z různých oblastí spektra elektromagnetického záření [34].

Podstatou této metody je absorpce ultrafialového a viditelného záření, v rozsahu 200 až 800 nm, zředěnými roztoky molekul. Principem je interakce mezi vazebnými a nevazebnými elektrony v orbitalech molekuly s fotony UV-VIS záření. Molekula se za běžných podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Při interakci molekuly s fotonem energie záření excituje tyto elektrony do vyšší energetické hladiny. Dochází tak k absorpci určitého množství záření o dané energii a vlnové délce. Vždy se absorbuje jen ta část záření, která odpovídá přechodu daného elektronu ze základní hladiny na hladinu excitovanou. Molekulová absorpční spektra jsou ve své podstatě spektra elektronová. Fotony UV a VIS záření mají dostatečnou energii k tomu, aby excitovaly jak elektronové stavy, tak i stavy vibrační a rotační. Výsledné absorpční spektrum je pak pásové, protože při jeho registraci jednotlivé diskrétní přechody většinou splývají v absorpční pás. Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu. Každý pás se popisuje vlnovou délkou jeho maxima (λ_{max}), která souvisí s rozdílem energií hladin, mezi kterými elektron přechází. Polohu pásu pak určují energie orbitalů, mezi kterými dochází k přechodu elektronu při excitaci. Vnitřní energie molekuly je dána součtem tří druhů energií, a to elektronové, vibrační a rotační, které nabývají jen určitých diskrétních hodnot odpovídajících hladinám energie. Mezi základní a excitovanou hladinou je velký energetický rozdíl (až 10^2 kJ/mol), menší rozdíl energie je mezi sousedními vibračními hladinami a nejmenší mezi energiemi rotačních hladin (10^{-2} kJ/mol) [34].

Nejčastěji měřenou veličinou je absorbance. Jedná se o záporně vzatý dekadický logaritmus transmitance, která vyjadřuje propustnost a je dán poměrem zářivého toku prošlého k dopadajícímu (Obr. 10) [34].

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

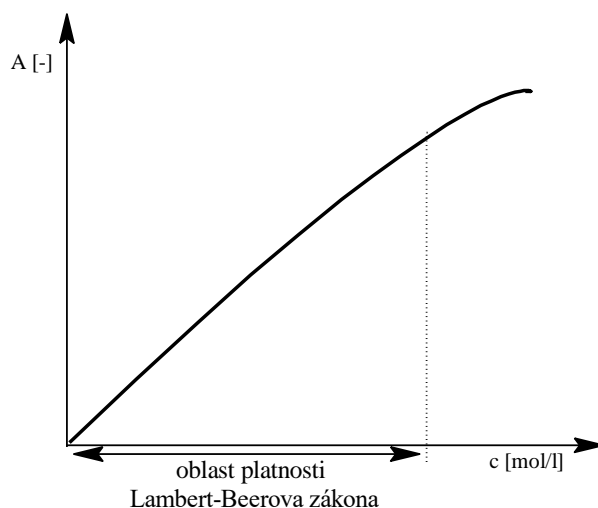


Obr. 10: Absorpce průchodu záření kyvetou se vzorkem o koncentraci c a absorpčním koeficientem ϵ , kde I_0 je dopadající zářivý tok a I prošlý zářivý tok [34]

Absorbanci lze také vyjádřit z Lambert-Beerova zákona (někdy také jako Bouguer-Lambert-Beerův zákon). Vyjadřuje lineární závislost absorbance na koncentraci absorbující látky a na tloušťce absorbující vrstvy. Tento zákon ale platí jen do určité oblasti koncentrace, a to pro velmi zředěné roztoky do koncentrace zhruba 10^{-2} mol/l. Popsaná závislost je zobrazena na Obr. 11 [34].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

kde A představuje absorbanci, ϵ je molární extinkční koeficient, který je definován pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce, c je koncentrace dané látky a l je optická dráha (většinou tloušťka kyvety). Absorbance je aditivní veličina, pokud absorbuje záření o dané vlnové délce dvě a více složek, je pak celková absorbance součtem absorbancí jednotlivých složek. [34].



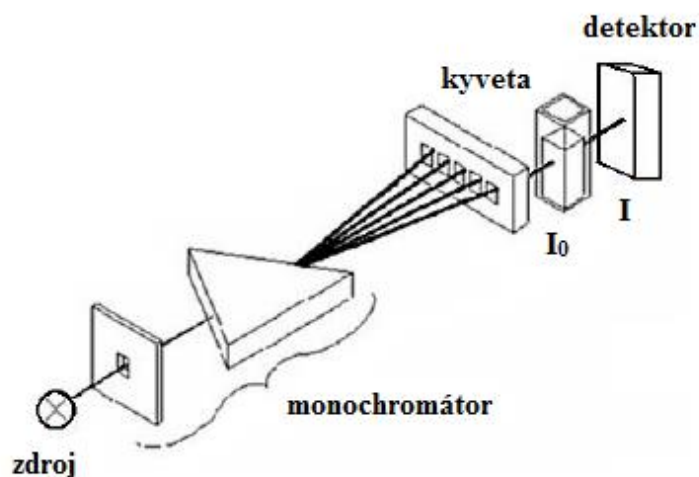
Obr. 11: Závislost absorbance na koncentraci

UV-VIS spektrofotometrie má využití v kvalitativní analýze, kde se ultrafialová a viditelná spektra využívají k identifikaci neznámé organické látky a k řešení strukturních otázek, a to porovnáním změřeného průběhu spektra se spektry známými. V kvantitativní analýze se měření absorbance využívá k určení koncentrace chromoforu ve vzorku. Nejčastěji se pracuje

metodou kalibrační křivky [34]. Kalibrační přímka se vytvoří proměřením absorpční řady roztoků o známé odstupňované koncentraci daného analytu. Z praktického hlediska je optimální oblast absorbancí od 0,1 do 1,1. V tomto intervalu by mělo být měření s nejnižší chybou. Při vyšších hodnotách je nutné roztok ředit. Nejvhodnější kalibrační křivka je lineární, která prochází počátkem souřadnicového systému [35].

2.5.1. Instrumentace

Jako zdroj záření se pro viditelnou oblast využívá wolframová žárovka či halogenová, která má až dvojnásobnou životnost než wolframová žárovka, je velmi účinná a její spektrum zasahuje až do UV oblasti [34]. Dnes se ale častěji využívá xenonová výbojka, která produkuje jasné bílé světlo, je stabilní, výkonná a má poměrně dlouhou životnost [35]. K výběru vlnové délky se pro jednodušší aplikace využívají různé filtry, kdy je potřeba vymezit jeden či dva rozsahy vlnových délek. Řadí se sem barevné filtry tvořené barevnými skly nebo interferenční filtry. Ve složitějších typech se nejčastěji setkáme s monochromátorem, který využívá Czerny-Turnerovu konstrukci. Záření o vybrané vlnové délce prochází kyvetou, ve které se nachází vzorek. Pro viditelnou oblast se využívají kyvety skleněné, pro oblast ultrafialovou kyvety křemenné [34]. Kyvety se mohou lišit nejen materiálem, ale i délkou. Nejčastěji se v praxi využívají kyvety s délkou 1 cm [35]. Detektory slouží k měření intenzity záření, které vzorek emituje nebo které prošlo vzorkem. Běžně využívaný detektor je fotonásobič, který je poměrně citlivý i při nízké intenzitě záření, ale je také citlivý na nárazy. Dále se využívá lineární diodové pole [34]. Obecné schéma instrumentace UV-VIS spektrofotometrie je zobrazeno na Obr. 12.



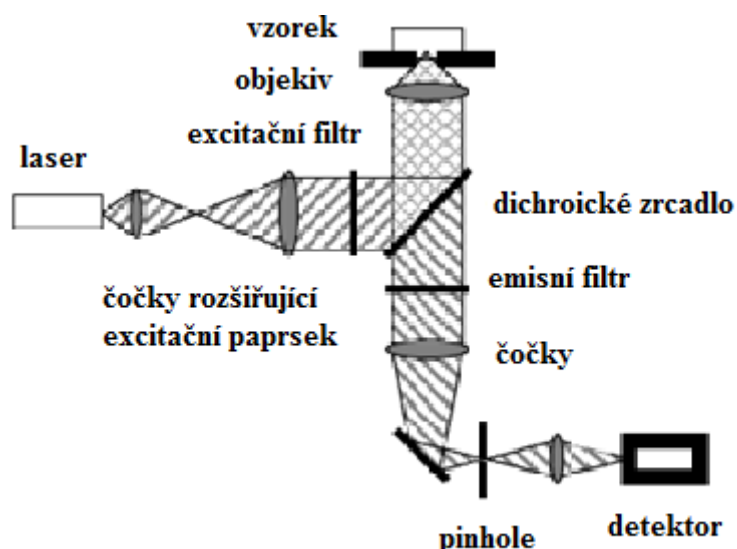
Obr. 12: Obecné schéma instrumentace UV-VIS spektrofotometrie [36]

2.6. Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie je poměrně novější metoda, která vznikla v 70. letech 20. století. Její prvotní uplatnění bylo pro sledování proteinů a nukleových kyselin na úrovni jednotlivých molekul, od té doby ale prošla mnohým vylepšením a dnes ji lze použít i na biologické aplikace, jako je např. měření uvnitř živých buněk. Využívá se konfokální mikroskop, který ale nevytváří obraz typický pro konfokální mikroskopii, ale umožňuje sledovat časové fluktuace (změny) intenzity fluorescence, které jsou způsobeny difúzním pohybem fluoreskujících molekul [37]. Díky zaznamenávání a analýze této fluktuace lze určit chemické nebo fyzikální parametry, jako je např. průtoková rychlost, difúzní koeficient, molekulová hmotnost, velikost částic a další [26]. Mikroskop je zaostřen do velmi malé oblasti, kdy detekční objem (oblast, ze které je snímána fluorescence) je cca 0,3 až 1 fl. V tomto objemu se při nanomolární koncentraci nachází řádově jedna fluoreskující molekula, která do detekčního objemu přichází a zase ho opouští, což se právě projeví na fluktuacích signálu. Když molekula do detekčního objemu vstoupí, tak intenzita fluorescence vzroste, když ho opouští, tak intenzita klesne. Ze statistické analýzy časově proměnlivého fluorescenčního signálu lze také určit průměrnou dobu molekuly v detekčním objemu, difúzní koeficient, koncentraci dané látky (dle počtu molekul přítomných v detekčním objemu) a také tzv. dobu života fluoroforu (jak dlouho molekula setrvala v excitovaném stavu) [37]. FCS se tak nevyužívá pro více koncentrované roztoky, kde se v malém objemu může nacházet mnoho molekul fluoroforů a docílí se tak konstantního signálu. Naopak u méně koncentrovaných látek se v malém objemu nachází méně molekul a tím jsou fluktuace větší [38].

2.6.1. Instrumentace

Experimentální zařízení pro FCS je invertovaný konfokální fluorescenční mikroskop (Obr. 13). Jako zdroj záření se využívají lasery. Laserový paprsek je pak fokusován do zkoumaného vzorku, ve kterém dochází k excitaci molekul a následná fluorescence excitovaných molekul je pak snímána objektivem. Emisní záření je odraženo zpět a přes dichroické zrcadlo a emisí filtr prochází až do detektoru. S tímto uspořádáním dochází k oddělení excitačního a emisního záření. V detekční části optické dráhy se nachází konfokální štěrbin (pinhole). Jedná se o štěrbinu s průměrem 40 až 100 μm , která efektivně blokuje světlo procházející z oblastí mimo ohniskovou rovinu [37]. Objektiv může být s vodní nebo olejovou imerzí. Nejčastěji se však používá s imerzí vodní.



Obr. 13: Zjednodušené schéma konfokálního mikroskopu, kde do objektivu je vedeno excitační laserové světlo a zde je fokusováno do vzorku a odraženo zpět přes dichroické zrcadlo, emisní filtr do detektoru [37]

Velký důraz se klade na výběr fluorescenční sondy. Je požadováno, aby měla vysoký kvantový výtěžek, ale zároveň by měla disponovat fotostabilitou a vydržet vysokou intenzitu záření v ohnisku mikroskopu [37].

2.7. Kinetika uvolňování

Využití hydrogelů se postupem času stále rozvíjí a dostalo se přes využití v potravinářském průmyslu, ve farmaceutickém průmyslu až k využití v tkáňovém inženýrství, jako biosenzory, nosiče léčiv k řízenému uvolňování nebo také krycí materiály na hojení ran. Zejména v posledních dvou zmíněných aplikacích se hydrogely stávají hlavní oblastí výzkumného zájmu a pár komerčních produktů bylo už i připraveno. Hydrogely mohou fungovat jako úspěšné nosiče léčiv, pokud se zná struktura jejich sítě a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, ale také pokud je sestaven nějaký matematicko-fyzikální model uvolňování léčiva z hydrogelů [8].

Léčivá látka může být do hydrogelu začleněna dvěma způsoby. První způsob spočívá v tom, že se nejdříve připraví gel a až poté se léčivo na tuto matici absorbuje. Uvolňování léčiva se pak určí pomocí difúze. Druhým způsobem je, že gelace probíhá už za přítomnosti léčivé látky. Uvolňování lze pak určit na základě interakce polymeru a léčiva nebo degradace vazeb mezi nimi [9].

Kinetika uvolňování je významně ovlivněna geometrií polymerní matrice, tedy hydrogelu, která může být ve tvaru koule, válce, nepravidelného tvaru nebo formě tenkého filmu [9]. Nanostruktura hydrogelu může být popsána třemi parametry. Objemový podíl polymeru $v_{2,s}$ v nabobtnalém stavu, který v podstatě vyjadřuje množství kapaliny, které může být absorbováno a zadrženo v hydrogelové matici. Lze ho vyjádřit jako poměr objemu polymeru V_p k objemu gelu V_g [8].

$$\nu_{2,s} = \frac{V_p}{V_g} \quad (3)$$

Druhým parametrem je průměrná molekulová hmotnost mezi dvěma sousedními příčnými vazbami \overline{M}_c . Vzhledem k tomu, že tyto vazby mohou být jak chemické, tak fyzikální, počítá se pouze průměrná hodnota. Tento parametr představuje stupeň zesíťování hydrogelu a je popsán Flory-Rehnerovou rovnicí [8].

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{M_n} = - \frac{\left(\frac{\overline{v}}{V_1} \right) \cdot [\ln(1 - \nu_{2,s}) + \nu_{2,s} + \chi_{12} \cdot \nu_{2,s}^2]}{\nu_{2,s}^{\frac{1}{3}} - \frac{\nu_{2,s}}{2}} \quad (4)$$

\overline{v} je objem polymeru, V_1 představuje molární objem vody a χ_{12} značí parametr interakce mezi polymerem a vodou [9]. Posledním parametrem je velikost ok sítě hydrogelu ζ , který je definován jako lineární vzdálenost mezi dvěma sousedními příčnými vazbami. Tento parametr závisí na několika faktorech, jako je stupeň zesíťování, chemická struktura a vnější podněty (teplota, pH, iontová síla atd.). Podle velikosti pórů pak rozlišujeme hydrogely makroporézní, mikroporézní a neporézní [9]. Typickou velikostí ok hydrogelů pro biomedicínské aplikace je 5 až 100 nm, což jsou mnohem větší rozměry, než mají některé menší molekuly léčiv, a jejich uvolňování není nijak zpomalováno. Oproti tomu makromolekuly (peptidy, proteiny, oligonukleotidy aj.) mohou mít větší rozměry, a tak jsou ve struktuře hydrogelu více zadržovány [8].

Mechanismus uvolňování také dále závisí na složení hydrogelu (typ polymeru, léčivé látky aj.), způsobu přípravy a na okolních podmínkách. Teoreticky lze kinetiku uvolňování popsat následovně. Nejdříve dochází ke smáčení povrchu hydrogelu „uvolňovacím“ médiem (např. voda). Toto médium začne pronikat do hydrogelu přes póry. Póry se naplní vodou a léčivo se začne postupně rozpadat na menší molekuly, případně může degradovat i polymer. Z hydrogelu se difúzí postupně degradované léčivo uvolňuje do okolního média, kde dochází k jeho rozpouštění. Hydrogelová matrice degraduje, což způsobí změnu pH uvnitř matrice a otok polymeru. Póry uzavřou a mění se tak geometrie hydrogelu. V médiu mohou nastat interakce mezi produkty degradace polymeru a léčivé látky s vodou. Všechny tyto jevy, ale nelze brát v potaz pro matematický model, berou se jen ty fyzikální a chemické procesy, které mají dominantní vliv a význam. Navíc tyto jevy se týkají uvolňování léčiva do modelového systému (voda), nikoliv do prostředí v živém organismu. Zde se musí navíc počítat s enzymatickou degradací, interakcí s bílkovinami, aktivním a pasivním transportem léčiva do buňky a interakcí s dalšími přítomnými sloučeninami. Z těchto důvodů se mechanismus uvolňování rozděluje na vnější a vnitřní difúzi, desorpci a chemickou reakci [9].

2.7.1. Vnější difúze

Vnější difúze zahrnuje difúzi molekul léčivé látky z povrchu hydrogelu do objemu kapalné fáze v okolí. Rychlost přenosu hmoty může být popsána následující rovnicí:

$$N_A = k_L \cdot (C_{AL}^* - C_{AL}^\delta)$$

nebo

$$G_A = k_L \cdot A \cdot (C_{AL}^* - C_{AL}^\delta) \quad (5)$$

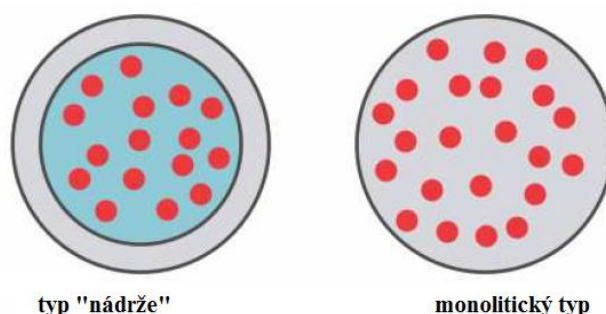
kde N_A je tok léčivé látky, G_A představuje rychlost přestupu hmoty, k_L je koeficient přestupu hmoty, C_{AL}^* je koncentrace léčivé látky na povrchu a C_{AL}^δ v objemu kapalné fáze, A představuje plochu, kterou daná látka prostupuje. Koeficient přestupu hmoty je vyjádřen následující rovnicí (6, kde $(D_{AB})_L$ je difúzní koeficient léčivé látky.

$$k_L = \frac{(D_{AB})_L}{\delta_L} \quad (6)$$

Koncentrace léčiva je nejvyšší v nejbližší blízkosti povrchu hydrogelové matrice. Rychlost uvolňování, ale nezávisí tolik na vnější difúzi jako na té vnitřní [9].

2.7.2. Vnitřní difúze

Vnitřní difúze je popsána na základě Fickových zákonů. Rozlišujeme dva typy systému, a to tzv. typ „nádrže“ a monolitické zařízení (Obr. 14).



Obr. 14: Schématické znázornění dvou typů systémů při uvolňování léčivé látky z hydrogelové matrice [9]

V systému typu „nádrže“ je léčivo v rozpouštěcím médiu obklopeno polymerní membránou. Tato membrána je značná bariéra pro uvolňování léčiva a jeho rychlost značně zpomaluje. Léčivo je nejdříve absorbováno touto membránou z vnitřního objemu. Uvolňování z této membrány pak popisuje první Fickův zákon difúze.

$$N_A = -D \cdot \frac{dC_A}{dx} \quad (7)$$

Kde N_A je difúzní tok dané látky, D představuje difúzní koeficient a $\frac{dC_A}{dx}$ koncentrační gradient. Difúzní koeficient lze chápat jako konstantu, která nám charakterizuje, jak snadno daná látka difunduje prostředím. Koncentrace léčiva na povrchu membrány se snižuje

s časem. V případě, že nedochází k rozpouštění membrány nebo naopak k jejímu nabobtnání, lze množství uvolňované látky popsat kinetikou prvního řádu:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A \cdot D \cdot K \cdot C_t}{l} = \frac{A \cdot D \cdot K}{l} \cdot \left(\frac{M_0 - M_t}{V} \right) \quad (8)$$

kde M_t je množství léčivé látky, které se uvolní v čase t , A značí celkovou plochu, D difúzní koeficient, K je koeficient rozdělení léčiva mezi membránou a „nádrží“, C_t představuje koncentraci léčiva v uvolňovacím médiu v čase t , l je tloušťka membrány, M_0 počáteční množství léčiva v systému a V je objem zásobníku dané léčivé látky. Toto platí pro případ, kdy počáteční koncentrace léčivé látky je menší než rozpustnost léčiva. V opačném případě platí vyjádření kinetikou nultého řádu:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A \cdot J_{\lim}}{l} = \frac{A \cdot D \cdot K \cdot C_s}{l} \quad (9)$$

kde J_{\lim} je limitující difúzní tok a C_s je rozpustnost léčiva v daném rozpouštědle. To platí pro systém, kdy je léčivá látka nerovnoměrně rozpuštěna nebo dispergována v polymerní matici. V tomto případě pak rychlost uvolňování plynule klesá, protože se zvýší délka difúzní cesty molekuly léčiva. Uvolňování v systému, kde je léčivo rovnoměrně dispergováno v celé polymerní matici, platí Fickův druhý difúzní zákon [9].

$$\frac{dC_A}{dx} = D \cdot \frac{d^2 C_A}{dx^2} \quad (10)$$

Pro tyto systémy geometrie neovlivňovala uvolňování léčivé látky, ale u monolitických systémů platí pravý opak a pro různé geometrie existují různé rovnice, kterými lze kinetiku uvolňování popsat. Ovšem tyto matematické modely jsou poměrně složité, proto pan Higuchi vyvinul matematickou rovnici, kterou lze použít pro systém s nejjednodušší geometrií, a to ve formě tenkého gelu a pro případ, že počáteční koncentrace léčiva je mnohem vyšší než rozpustnost dané látky.

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{D \cdot (2 \cdot C_0 - C_s) \cdot C_s \cdot t} \quad (11)$$

Kde C_0 je počáteční koncentrace léčiva a C_s představuje jeho rozpustnost. Tato rovnice může být zjednodušena na následující tvar:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot \sqrt{t} \quad (12)$$

kde M_∞ představuje absolutní množství léčiva, které se uvolní v čase t a které by mělo být rovno počátečnímu množství léčiva v systému v čase 0. K pak představuje konstantu daného systému. Tento model lze použít, pokud systém splňuje několik podmínek, např. pokud počáteční koncentrace je mnohem vyšší než rozpustnost léčiva, pokud molekuly léčivé látky jsou mnohem menší než tloušťka hydrogelu, kterou musí překonat a pokud polymerní matrice nebobtná ani se nerozpouští. Tento model je považován za nejjednodušší vyjádření. Existují i složitější modely kinetiky uvolňování z monolitických systémů, které jsou závislé na jejich geometrii [9].

2.7.3. Desorpce

Třetím krokem uvolňování je desorpce. Molekuly léčiva mohou být absorbovány do pórů buď chemicky, nebo fyzikálně. Poté následuje desorpce z těchto pórů do celého objemu. K tomu, aby mohl být sestaven matematický model, berou se v úvahu určité předpoklady, a to že distribuce pórů v hydrogelu je homogenní, pohyb molekul lze popsat Fickovým prvním zákonem difúze a difúzní koeficient je konstantní [9].

2.7.4. Chemické reakce

Posledním krokem jsou chemické reakce, které nastávají po uvolnění molekul léčiva do okolního prostředí. Dochází zde k reakcím těchto molekul s okolním médiem, s produkty degradace polymeru, kdy tyto produkty mohou reagovat s okolním médiem také. Tyto chemické reakce mohou být vratné i nevratné, jednoduché i složité, pomalé i rychlé. To vždy záleží na dané léčivé látce, polymeru a okolním prostředí [9].

2.7.5. Změny v hydrogelové matici

Během celého procesu uvolňování velmi často dochází ke změně tvaru hydrogelové matrice. Důležitou změnou je štěpení řetězce. Tento proces je nutný, protože molekuly léčiva jsou vázány na polymerní řetězec a k tomu, aby se tato látka uvolnila, je nutné tyto vazby rozštěpit. Rychlost jeho uvolnění je pak závislá na rychlosti štěpení této vazby. Další změna, která může nastat, je bobtnání gelu. Také může nastat postupná degradace povrchu polymerní matrice. V okolním prostředí se vyskytují různé enzymy, které mohou enzymaticky štěpit povrch hydrogelu. Tento proces je velmi rychlý, je rychlejší, než aby byl enzym transportován dovnitř hydrogelu [9].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Interakce polyelektrolyt – tenzid

Interakcí mezi záporně nabitým polymerem a kladně nabitým tenzidem ve vodě se zabýval švédský tým *Thalberga K.* Jako polyelektrolyt použili hyaluronan a jako tenzid alkyltrimethylamonium bromid s různě dlouhými alkylovými řetězci (8, 9, 10, 12 a 16 uhlíků). Interakce byla zkoumána pomocí metody NMR, vodivosti, solubilizace barviv a polarimetrie. Výsledkem bylo, že interakce pobíhá mezi hyaluronanem a tenzidem o 10 a více atomů uhlíku v alkylovém řetězci. Pro tenzid s 8 a 9 atomy uhlíků nebyly pozorovány žádné fázové separace, jelikož je pro ně energeticky výhodnější tvorba volných micel. Také bylo pozorováno, že vzhled počáteční sraženiny je závislý na koncentraci tenzidu. Při nízkých koncentracích se jedná o téměř průhlednou sraženinu, naopak při vyšších koncentracích vznikala až mléčná sraženina. Průběh fázové separace je rychlejší při použití hyaluronanu s nižší molekulovou hmotností. Dále bylo zjištěno, že tenzid se na řetězec polymeru váže při určité koncentraci, která je vždy nižší než CMC. Při zvyšování koncentrace tenzidu dojde ke zvýšení jeho navázaného množství, ale koncentrace volných molekul je stále konstantní. Dalším zvýšením koncentrace tenzidu pak dochází ke vzniku volných micel v roztoku. Také bylo zjištěno, že díky nižší lineární hustoty na hyaluronanu, je vazba mezi tenzidem a polymerem podstatně slabší než u ostatních polyelektrolytů s karboxylovou skupinou [39].

Tvorbou komplexů polyelektrolyt-tenzid, se také zabývali *Shulevich V. a spol.* Hydrogely získali templátovou polymerací iontového monomeru v micelárním roztoku s opačně nabitým tenzidem a studovali je pomocí nefelometrie, polyelektrolytové titrace a dynamického rozptylu světla (DLS). Jako monomer byl použit methakryloyloxyethyl trimethyl amonium methylsulfonát v acetonu a dále byl použit anionaktivní tenzid dodecylsulfát sodný (SDS). Zjistili, že takto připravené komplexy mají odlišné vlastnosti než ty, které vznikají smícháním roztoků. Výsledné komplexy byly znatelně rozpustné ve vodě díky volným makromolekulám polymeru, které se nenavázaly na ionty tenzidů. Tato skutečnost je ale omezena koncentrací tenzidu. Při vyšších koncentracích dochází ke tvorbě sraženiny, která je ve vodě nerozpustná. Dále bylo vypořádováno, že rozdíl ve viskozitě mezi takto připravenými komplexy a komplexy připravenými smícháním roztoků, je téměř nepatrný. Určité množství monomeru se nachází navázané na micelách a některé množství je volně v roztoku. Monomery na micelách mají určitou orientaci kvůli elektrostatickým silám a díky tomu podléhají polymeraci rychleji než monomery volně v roztoku. Složitá struktura těchto komplexů má ale své defekty, které mohou být vratné nebo nevratné [40].

Tým *Sauerové P. a spol.* se zabýval interakcí mezi kladně nabitým tenzidem a záporně nabitým polymerem. Jako tenzid byl použit cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a karboxypendecinium bromid (Septonex). K interakci s CTAB byl využit Hya o molekulové hmotnosti 1 000 kDa a se Septonexem o molekulové hmotnosti 936 kDa. Takto připravené komplexy byly studovány na základě cytotoxicity povrchově aktivních látek, které mají škodlivé účinky pro různé typy buněk, jako jsou např. bakterie, houby, savčí buňky aj.

Cytotoxicita byla testována po 24 hodinách léčby na osteoblastech, které se prokázaly být dobře reprodukovatelnou buněčnou linií. Tyto buňky byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu. V minulých studiích vědeckého týmu při léčbě osteoblastů pomocí CTAB s nízkou koncentrací nedocházelo k nijak výraznému snížení životnosti buněk. I po přidání Hya k CTAB byla cytotoxicita lehce utlumena. Avšak s rostoucí koncentrací dochází k značnému snížení metabolické aktivity buněk. V této studii postupovali tak, že do buněk byl přidán předem připravený komplex Hya a tenzidu, nikoliv jako v minulé studii, že tam tyto látky byly přidávány zvlášť. Na těchto komplexech byly studovány dva základní parametry, které jsou důležité pro předpokládané interakce s buňkami, a to velikost a náboj. Měření velikosti částic nevykazovalo žádnou závislost na koncentraci. Všechny komplexy se jevily jako polydisperzní soustavy. Polydisperzita byla způsobena přítomností hyaluronových řetězců, protože koncentrace CTAB byla velmi nízká. Tyto polymerní řetězce obsahovaly různý počet navázaných micel nebo přítomností biopolymerních řetězců připojených k tzv. indukovaným micelám (micelární struktury, které se tvoří při koncentraci nižší, než je CMC). Pomocí zeta potenciálu bylo zjištěno, že převažuje negativní náboj komplexů. Komplexy připravené ze Septonexu měli podstatně nižší hodnoty zeta potenciálu než ty připravené z CTAB. U CTAB má většinou snížení koncentrace Hya za následek zvýšení hodnoty zeta potenciálu. Cytotoxické následky měl CTAB při vyšších koncentracích (8 μ M a 10 μ M). Při přidání Hya o vyšších koncentracích (3 mg/l) došlo k významnému snížení negativních účinků CTAB. Tohoto by se dalo využít v případech, kde by CTAB hrálo roli jako dezinfekční činidlo. U Septonexu byly pozorovány podobné výsledky. Pokud byl použit pouze Septonex, docházelo k snížení metabolické aktivity, a to při vyšších koncentracích tenzidu. V přítomnosti Hya docházelo k snížení cytotoxicity Septonexu. V případě Septonexu, ale nebyly pozorovány tak velké rozdíly jako u CTAB, ale lze říci, že Septonex je více cytotoxický [41].

Tým **Halasové T.** studoval interakci mezi Hya o dvou molekulových hmotnostech (90 kDa a 1,4 MDa) s tenzidy v roztoku NaCl, a to pomocí tenziometrie a fluorescenčních sond. Výsledkem této studie je skutečnost, že tvorba micel probíhá v určitém intervalu koncentrací tenzidu, proto je vhodnější hovořit o oblasti, ve které se micely tvoří než o jedné hodnotě CMC, a to zejména pokud je v systému přítomen Hya, který tuto oblast ještě více rozšiřuje. Největší vliv hyaluronanu se nacházel v systému s neionogenním Tween 20 a kationaktivním CTAB. Z dřívějších studií je znám fakt, že přítomnost NaCl (tedy zvýšením iontové síly) potlačuje elektrostatickou interakci mezi polymerem Hya a tenzidem. Výsledky této studie ale dokazují, že tyto interakce se v těchto systémech nachází, aniž by záleželo na typu tenzidu [42].

Strukturní chování Hya při jeho interakci s opačně nabitým tenzidem studoval **Buchold P. a spol.** Jako opačně nabitý tenzid byl použit tetradecyltrimethylamonium bromid (TTAB) při jeho vysokých koncentracích. Strukturní chování bylo pozorováno pomocí rozptylu světla, malouhlového rozptylu neutronů a reologie. Výsledkem této studie bylo, že Hya si stále zachovává své viskózní vlastnosti i při vysokých koncentracích TTAB. To je nejspíš způsobené tím, že vzniklý komplex má tyčovitou strukturu, která se velmi špatně rozpouští, micely tenzidu s polymerem reagují velmi slabě a při velmi vysokých koncentracích TTAB dochází

k rozpínání struktury vzniklého komplexu. Při vyšších koncentracích Hya však nedochází k zásadnímu ovlivnění zapletení polymeru ani ovlivnění struktury micel [43].

3.2. Uvolňování z hydrogelů

Uvolňováním léčivé látky z hydrogelu se zabýval **M. J. Caicco a kolektiv**. Hydrogel využili k uvolňování léčivé látky Cyklosporin A (CsA), který stimuluje nervové buňky a měl by tak velký potenciál pro léčbu následků cévní mozkové příhody. Prokázalo se totiž, že CsA působí jako podpůrná látka při „přežití“ nervových buněk po jejich poškození, a to i po dobu několika týdnů jak in vitro, tak in vivo. Při dodávání této látky systémově, ale dochází k inhibici T-lymfocytů a může dojít až k selhání imunitního systému. Proto je vhodné tento lék podávat lokálně na postižené místo. Pro tyto účely byl využit hydrogel hyaluronanmethylelulósy (HAMC), který byl připraven právě z hyaluronanu sodného a methylelulósy. Uvolňování bylo pozorováno při třech způsobech zabudování CsA, a to pomocí solubilizace CsA jako roztoku, jako prášku a v podobě mikrokuliček z poly(mléčné-ko-glykolové) kyseliny (PLGA). K pokusu byly využity dospělé myši. Konkrétně ke studiu uvolňování CsA in vivo byly odebrány buňky z předního mozku dospělých samců. Při uvolňování in vitro byly dospělým myším vyvrtány díry v lebce, přes které byly příslušné HAMC implantovány. Zda se něco uvolnilo nebo ne bylo zjištěno tak, že zvířata byly usmrceny po 6, 12, 18 a 24 dnech po implantaci gelu, poté byl gel vyjmut a rozpuštěn v acetonitrilu, aby se extrahovalo zbylý CsA, který se neuvolnil do okolní tkáně v mozku. Pro kvantitativní detekci byla použita metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Výsledkem této studie bylo, že roztok CsA se z gelu uvolnil v řádu hodin, práškový CsA po několika dnech a CsA zapouzdřené v mikrokuličkách PLGA je schopna se uvolnit v nepozměněném stavu během 24 hodin. Také bylo dokázáno, že léčivá látka CsA je vhodnou pro léčbu poškozených mozkových buněk po mrtvici. [44]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

Hyaluronan sodný

HYA č. 8 (1400-1600 kDa), $M_w = 1\,540$ g/mol, č. šarže: 181214-4-D1, vlhkost: 8,811 %

HYA č. 9 (250-450 kDa), $M_w = 340$ g/mol, č. šarže: 230215-E1, vlhkost: 6,183 %

HYA č. 14 (1400-1600 kDa), $M_w = 1\,540$ g/mol, č. šarže: 181214-4-D1, vlhkost 10,970 %

Septonex (karbethopendecinium bromid)

$M_w = 422,48$ g/mol, č. šarže: 511SEP003

Sodná sůl fluoresceinu

$M_w = 376,28$ g/mol, $E_{ec} = 490$ nm, CAS: 518-47-8, Sigma Aldrich,

Akridinová oranž

$M_w = 438,1$ g/mol, CAS: 10127-02-3, Sigma Aldrich

Deionizovaná voda

H₂O, systém ELGA

Chlorid sodný

NaCl, $M_w = 58,44$ g · mol⁻¹, CAS: 7647-14-5, Penta s.r.o., č. šarže: 1903200314

4.2. Použité metody

4.2.1. Příprava zásobních roztoků

K přípravě hydrogelů byl použit Septonex o koncentraci 50 mM, 100 mM a 200 mM. K přípravě těchto zásobních roztoků byl použit roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, který byl připraven rozpuštěním 8,766 g NaCl v 1 000 ml deionizované vody. Pro všechny zásobní roztoky Septonexu byl použit stejný objem roztoku NaCl, a to 100 ml. V tomto objemu bylo rozpuštěno takové množství tenzidu, aby bylo dosaženo požadované výsledné koncentrace. Takto připravené zásobní roztoky byly ponechány přes noc na magnetické míchačce, aby došlo k úplnému rozmíchání a homogenizaci směsi. Poté byly zásobní roztoky ponechány při laboratorní teplotě.

Dále byl použit Hya o dvou molekulových hmotnostech, a to 340 g/mol a 1 540 g/mol. Pro přípravu těchto zásobních roztoků byl také použit roztok NaCl o koncentraci 0,15 M o stejném objemu 30 ml, ve kterém bylo rozpuštěno takové množství příslušného Hya, aby bylo dosaženo požadované výsledné koncentraci 2 hm. %. Takto připravené zásobní roztoky Hya byly ponechány přes noc na magnetické míchačce, aby došlo k úplnému rozmíchání a homogenizaci směsi a následně byly roztoky uchovány v chladničce.

Solubilizované látky byly připraveny následujícím způsobem. Do skleněné nádoby byl připraven zásobní roztok fluoresceinu v roztoku NaCl o koncentraci 1 mM. Pro účely přípravy kalibrační řady byl také připraven zásobní roztok fluoresceinu v deionizované vodě a roztoku Septonexu o třech různých koncentracích. Zásobní roztoky byly uchovány v chladničce. Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok AO.

4.2.2. Příprava gelů

Hydrogely byly připraveny dvěma způsoby. Metodou *mokrý cestý* bylo do suchých a čistých skleněných vialek převedeno 3 ml roztoku Hya a poté bylo napipetováno 3 ml Septonexu o příslušné koncentraci. K takto připraveným gelům byl napipetován příslušný objem fluoresceinu a AO, tak aby výsledná koncentrace fluorescenční sondy v gelu byla 1 μ M. Vialky byly zavičkovány, krátce promíchány na vortexu, aby došlo k promíchání všech složek, a poté byly ponechány přes noc na třepačce. Metodou *suchý cestý* bylo do suchých a čistých skleněných vialek na analytických vahách naváženo dané množství Hya, aby jeho výsledná koncentrace byla 2 hm. %. Poté bylo na analytických vahách naváženo příslušné množství Septonexu, aby bylo dosaženo požadované výsledné koncentrace. K této směsi prášků byl napipetován daný objem fluoresceinu a AO, aby výsledná koncentrace fluorescenční sondy byla 1 μ M a nakonec bylo přidáno 6 ml roztoku NaCl o koncentraci 0,15 M. Vialky byly zavičkovány, krátce promíchány na vortexu a poté byly přes noc ponechány na třepačce.

4.2.3. Příprava kalibračních roztoků

Pro stanovení koncentrace dané solubilizované látky v supernatantu pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie byla připravena kalibrační řada dané látky v NaCl, deionizované vodě a Septonexu o třech koncentracích. Pro rozpouštědlo NaCl a deionizovaná voda byla zvolena stejná koncentrační řada, pro 50 mM a 100 mM také. Konkrétní hodnoty koncentrací jsou vypsány v Tab. 5 v kapitole 9.1. Jednotlivé roztoky pro kalibrační řadu byly připraveny ředěním zásobních roztoků (jejich příprava popsána v kapitole 4.2.1) fluoresceinu a AO s jednotlivými rozpouštědly. U jednotlivých roztoků byla následně proměřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru. Každá kalibrační řada byla znovu připravena, a to dohromady 3krát. U každé nově připravené koncentrační řady byla znovu proměřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru. Pro metodu FCS byla připravena kalibrační řada fluoresceinu a AO pouze v roztoku NaCl. Pro obě solubilizované látky byla zvolena stejná koncentrační řada (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 μ M).

4.2.4. UV-VIS spektrofotometrie

Měření absorbance bylo provedeno na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary50 Probe. Jedná se o spektrofotometr s jednopaprskovým uspořádáním. Pro tyto účely byla využita plastová kyveta o délce 1 cm. Princip metody byl popsán v kapitole 2.5. UV-VIS spektrofotometr byl použit k změření absorbance fluoresceinu a AO v daných rozpouštědlech a také k proměření absorbance těchto látek v supernatantu (nizkoviskózní část nad vzniklým gelem). Absorbance byla změřena po 24, 48 a 72 hodinách od doby přípravy. Po změření absorbance supernatantu nad vzniklým gelem byl vždy supernatant slit a vyměněn za 5 ml roztoku NaCl. Data byla zobrazena pomocí softwaru CaryWinUV, ze kterého byly data exportována do programu Excel, kde byla následně vyhodnocena.

4.2.5. FCS – Systém MicroTime 200

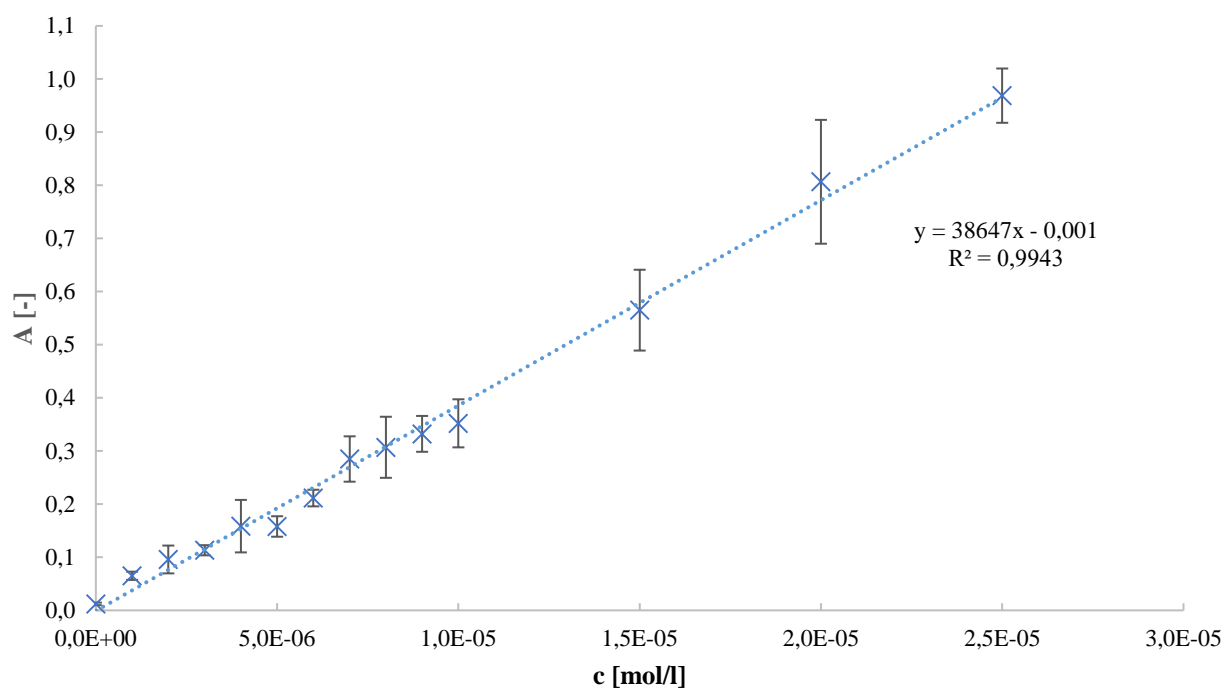
Přístroj pro měření metodou fluorescenční korelační spektroskopie se skládá z několika částí, z nichž ty nejhlavnější jsou mikroskop Olympus IX 71 s dvěma imerzními objektivy a jedním suchým objektivem, excitační zdroje, pulsní laserové diody o vlnových délkách 375, 470, 510 a 640 nm a čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z těchto kanálů jsou typu Excelitas a dva zbylé typu MPD-SPAD. Další část přístroje je také externí spektrograf s CCD kamerou Newton, který umožňuje snímat stacionární fluorescenční spektra současně s probíhajícím konfokálním experimentem.

Pro tento experiment byl použit mikroskop s objektivem s vodní imerzí, excitační zdroj o vlnové délce 470 nm, emisní filtr a detektor τ -SPAD 1. Byla sledována intenzita fluorescence, a to jak u roztoků kalibrační řady, tak u supernatantů připravených hydrogelů. Intenzita fluorescence byla měřena po 24, 48 a 72 hodinách od doby přípravy. Po ukončení jednotlivého měření byl vždy supernatant vzniklý nad gelem slit a vyměněn za 5 ml roztoku NaCl. Data byla zobrazena pomocí programu SymPhoTime 64.

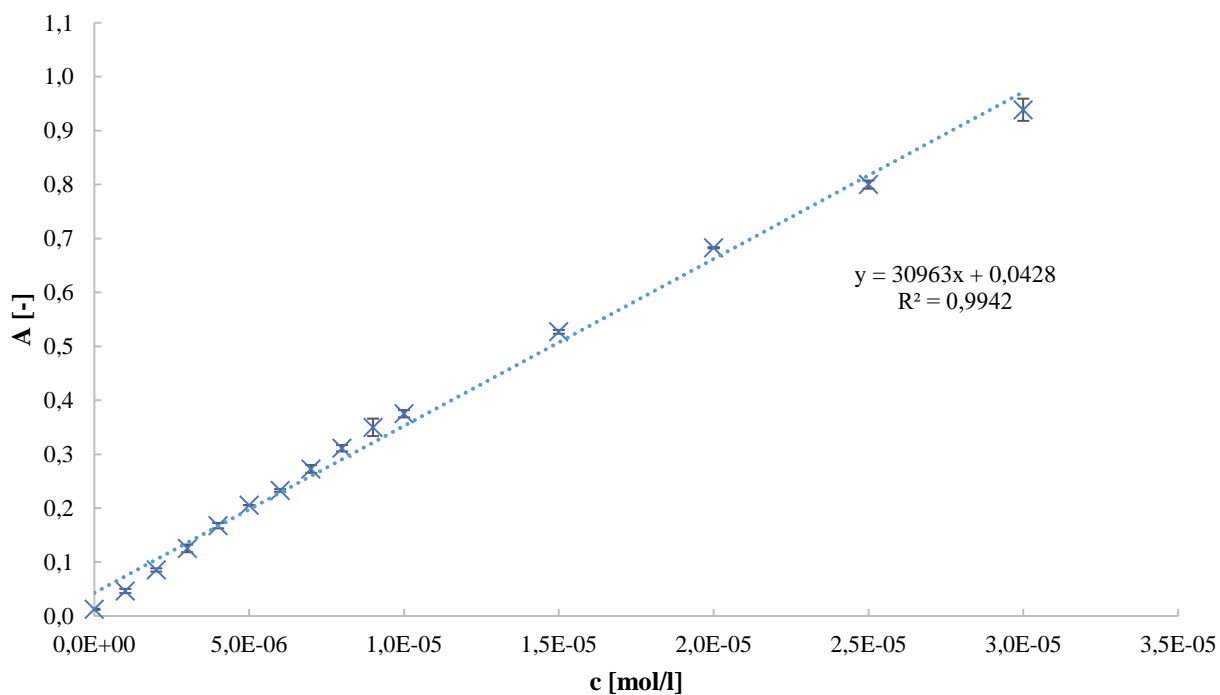
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Kalibrační křivky – UV-VIS spektrofotometrie

K určení solubilizací kapacity hydrogelů bylo potřeba sestavit kalibrační křivky fluoresceinu a AO v daných rozpouštědlech, a to proměření absorbance těchto kalibračních roztoků pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Hodnoty absorbance byly brány při absorpčním maximu daných látek, které nastává při 490 nm. Kalibrační přímka byla sestavena v programu Excel jako závislost naměřené absorbance na koncentraci. Důležité kalibrační křivky jsou pro fluorescein (Obr. 15) a AO (Obr. 16) v roztoku NaCl, podle nichž se výsledně počítala koncentrace fluorescenční sondy v supernatantu. Hodnoty naměřených absorbancí jednotlivých kalibračních řad jsou uvedeny v Tab. 6 pro fluorescein a v Tab. 7 pro AO v kapitole 9.2. Z naměřených hodnot absorbancí byly vypočteny průměrné hodnoty pro jednotlivé koncentrace. Z těchto hodnot byl následně sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci. Z naměřených hodnot absorbancí byly použity jen ty hodnoty, které byly menší než 1, aby byla zachována lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací.

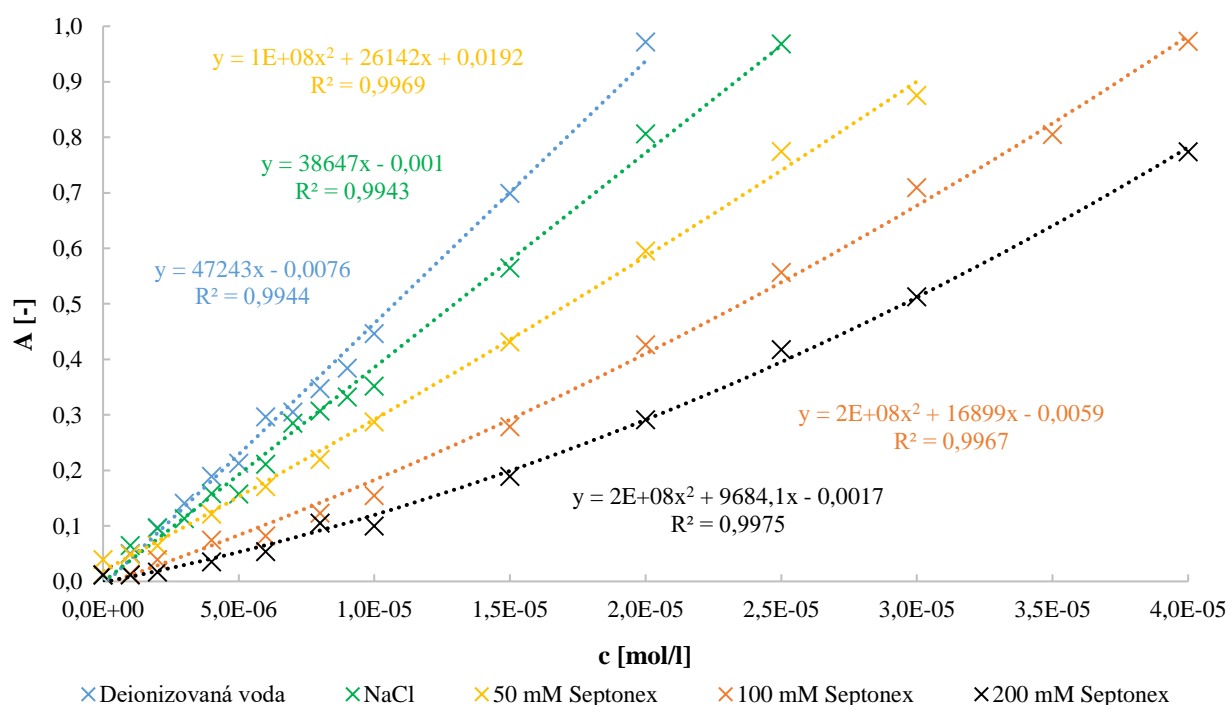


Obr. 15: Kalibrační přímka pro koncentrační řadu fluoresceinu v roztoku NaCl

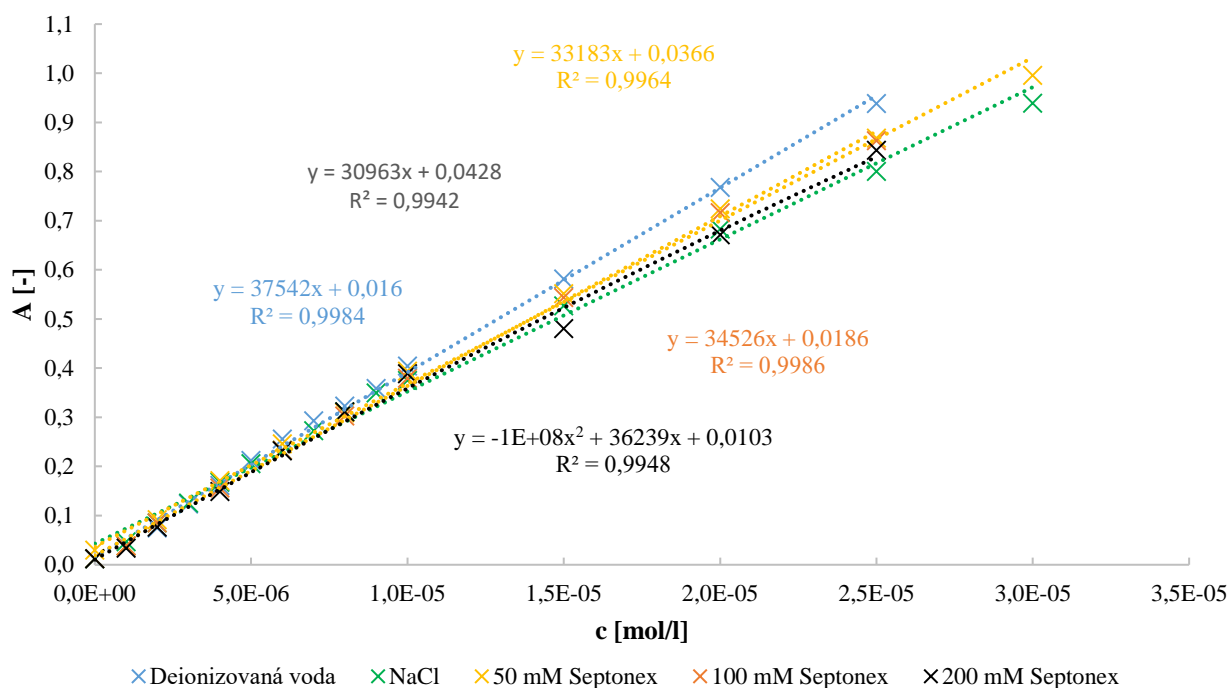


Obr. 16: Kalibrační křivka pro koncentrační řadu AO v roztoku NaCl

Obě solubilizované látky byly kromě roztoku NaCl také rozpuštěny v dalších rozpouštědlech, a to v deionizované vodě a v 50, 100 a 200 mM Septonexu. Výsledný graf je na Obr. 17 pro fluorescein a na Obr. 18 pro AO. Z výsledného grafu pro fluorescein lze pozorovat, že roztok NaCl oproti deionizované vodě způsobuje snižování absorbance. Stejný jev lze pozorovat i se zvyšující se koncentrací Septonexu. Tento jev byl pozorovatelný i pouhým okem, kdy např. pro koncentraci fluoresceinu 2 μM ve vodě bylo zbarvení mnohem intenzivnější než pro stejnou koncentraci fluoresceinu, který byl ale rozpuštěn v 50 mM Septonexu. U stejné koncentrace fluoresceinu rozpuštěného v 200 mM Septonexu se roztok zdál téměř bezbarvý. U fluoresceinu rozpuštěného v Septonexu při nižších koncentracích neplatí lineární vztah a dochází k ohybu křivky. To je pravděpodobně způsobené volbou velmi nízkých koncentrací, kdy nelze brát v úvahu platnost Lambert-Beerova zákona. Pro AO totéž říct nelze. Zde má větší vliv na snižování absorbance NaCl než Septonex. Rozdíly v chování AO v Septonexu o třech koncentracích jsou velmi malé, ale přece jen 50 mM Septonex snižuje absorbanci méně než 100 a 200 mM Septonex. Největší snížení absorbance lze však pozorovat u roztoku NaCl. AO je kladně nabitá molekula, stejně jako tenzid. Proto interakce mezi nimi nejsou takové, jako při záporně nabitém fluoresceinu, který lépe interaguje s kladně nabitým povrchem micely tenzidu. V roztoku NaCl může molekula AO reagovat se zápornými ionty a tím tak dochází k většímu zhášení než u roztoku Septonexu.



Obr. 17: Srovnání kalibračních křivek fluoresceinu v různých rozpouštědlech.



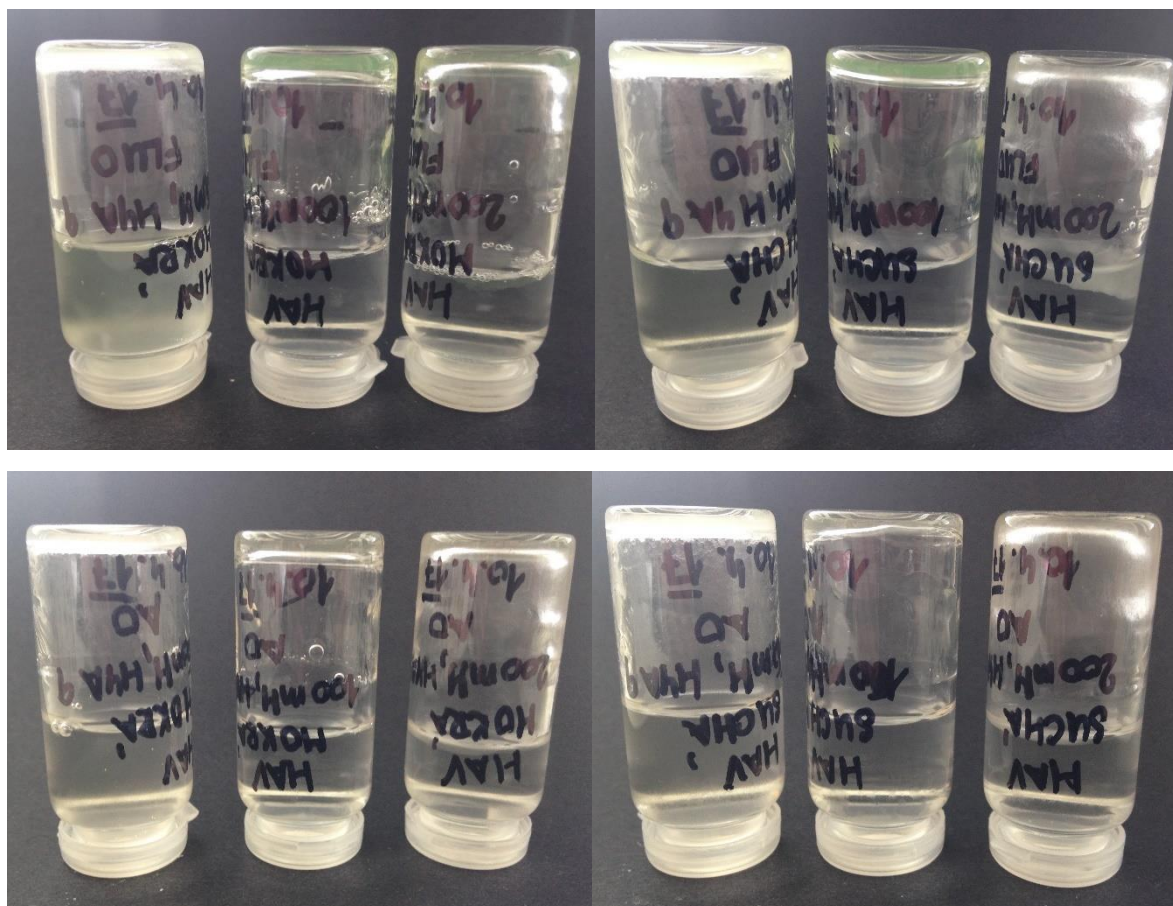
Obr. 18: Srovnání kalibračních přímek AO v různých rozpouštědlech.

5.2. Příprava hydrogelů

Hydrogely byly připraveny dvěma způsoby, které byly popsány v kapitole 4.2.2. U hydrogelu, který vznikl smícháním hyaluronanu s 50 mM Septonexem vznikl silný zákal supernatantu, který u většiny případů nemizel ani po 48 a 72 hodinách. Zákal vzniklý po přípravě hydrogelu je způsobený tím, že část tenzidu se spotřebuje na zesíťování s Hya a podílí se na vzniku gelu. Část, která se na gelaci nepodílí, interaguje s nadbytečným Hya, kterého donutí sbalit se a částečně tak vykompenzuje náboj Hya. Nejméně koncentrovaný Septonex není v takovém nadbytku, aby mohl vykompenzovat veškerý náboj Hya, v supernatantu se tak nachází v nadbytku právě Hya a vzniká zakalený supernatant. U nejvíce koncentrovaného Septonexu je v nadbytku a interaguje s téměř všemi molekulami Hya, proto se pak supernatant jeví jako čirý roztok. I po slití supernatantu a napipetování nového roztoku NaCl docházelo ke vzniku zákalu, který nebyl tak silný jako po 24 hodinách. To lze vysvětlit rozpouštěním hydrogelu v novém roztoku elektrolytu, čímž by mohlo být podpořeno uvolňování solubilizované látky. U gelu s vyšší molekulovou hmotností Hya a s 50 mM Septonexem vznikl silně zakalený a viskózní supernatant. To je způsobené právě hyaluronanem o vyšší molekulové hmotnosti, který sám o sobě je velmi viskózní roztok a v supernatantu je v nadbytku. Po 48 hodinách se zákal objevil jen u 50 mM Septonexu, po 72 hodinách se jeví téměř všechny supernatanty jako čiré roztoky. Způsob přípravy neměl na tvorbu zákalu nijak velký vliv. Ve většině případů při mokré i suché cestě přípravy hydrogelu docházelo ke vzniku silného zákalu v případě použití 50 mM Septonexu, lehce zakalený roztok nad gelem vznikl při použití 100 mM Septonexu a čirý supernatant vznikl u hydrogelu s 200 mM Septonexem. Popis vzniklého supernatantu pro případ Hya o nižší molekulové hmotnosti je naznačen v Tab. 1 až Tab. 3. Vzniklé hydrogely a supernatant nad

Tab. 1: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti (HYA 9) se Seponexem o třech různých koncentracích spolu s fluoresceinem a AO. Poté byly sledovány po 24 hodinách od jejich přípravy.

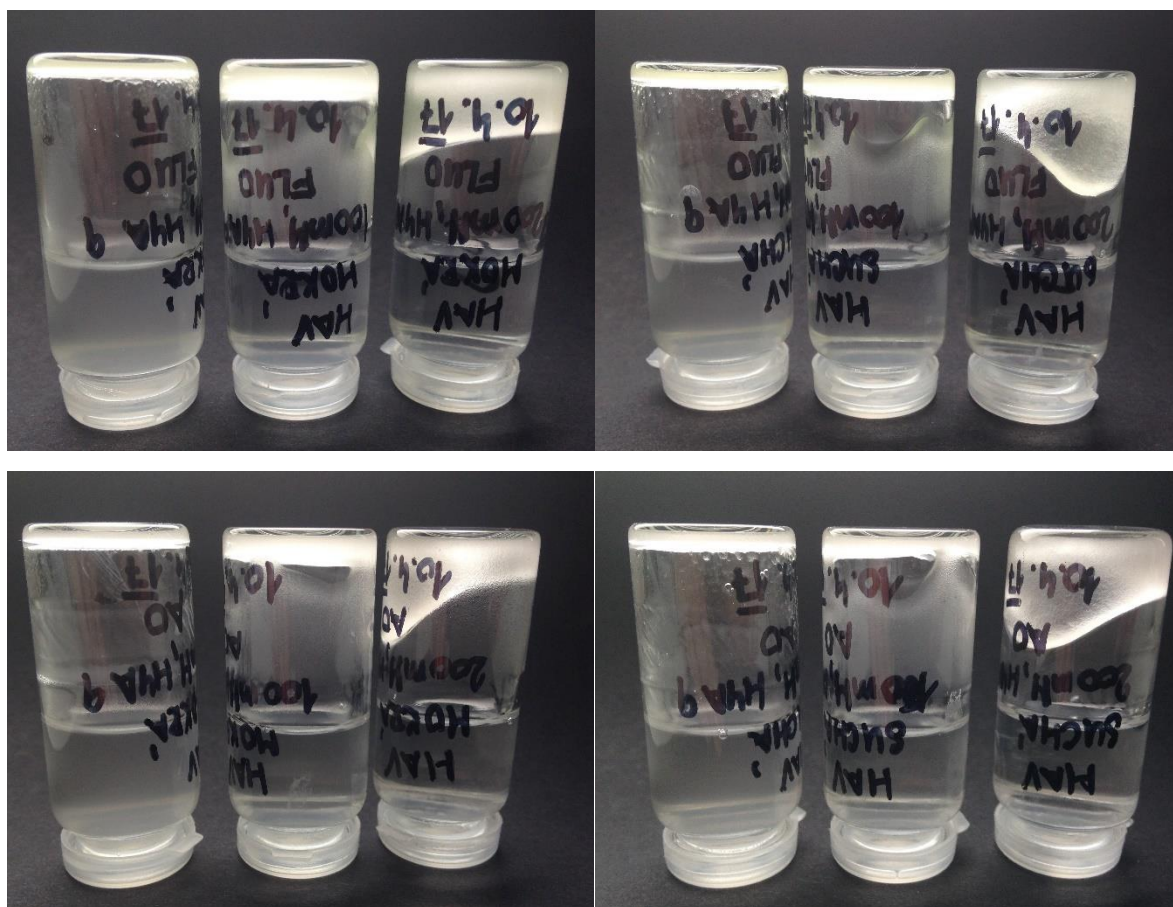
Hydrogely - 24 hodin				
	Mokr� cest� (HYA 9)		Such� cest� (HYA 9)	
Pou�it� Septonex	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	zakalený	zakalený	zakalený	zakalený
100 mM	lehce zakalený	�ir�	�ir�	lehce zakalený
200 mM	�ir�	�ir�	�ir�	�ir�



38

Tab. 2: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti (HYA 9) se Septonexem o třech různých koncentracích spolu s FLUO a AO. Poté byly sledovány po 48 hodinách od jejich přípravy

Hydrogely - 48 hodin				
	Mokrý cesta (HYA 9)		Suchá cesta (HYA 9)	
Použitý Septonex	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	zakalený	zakalený	zakalený	zakalený
100 mM	lehce zakalený	lehce zakalený	čirý	lehce zakalený
200 mM	čirý	čirý	čirý	čirý



Obr. 20: Ukázky hydrogelů připravené smícháním HYA 6 o nižší molekulové hmotnosti, Septonexu o třech různých koncentracích (vždy zleva 50, 100 a 200 mM Septonex) a fluoresceinu (horní řada) a AO (spodní řada), po 48 hodinách od jejich přípravy. Obrázky se liší způsobem přípravy, kdy vlevo jsou hydrogely připravené metodou mokré cesty a vpravo metodou suché cesty. Lze si všimnout, že u gelů s 50 mM Septonexem v obou případech vznikl zakalený supernatant. Zákal je lehce patrný i gelů se 100 mM Septonexem.

Tab. 3: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o nižší molekulové hmotnosti (HYA 9) se Septonexem o třech různých koncentracích spolu s FLUO a AO. Poté byly sledovány po 72 hodinách od jejich přípravy

Hydrogely - 72 hodin				
	Mokrý cesta (HYA 9)		Suchá cesta (HYA 9)	
Použitý Septonex	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	lehce zakalený	čirý	čirý	čirý
100 mM	čirý	čirý	čirý	čirý
200 mM	čirý	čirý	čirý	čirý



Obr. 21: Ukázky hydrogelů připravené smícháním HYA 9 o nižší molekulové hmotnosti, Septonexu o třech různých koncentracích (vždy zleva 50, 100 a 200 mM) a FLUO (horní řada) a AO (spodní řada) po 72 hodinách od jejich přípravy. Obrázky se liší způsobem přípravy, kdy vlevo jsou hydrogely připravené mokrou cestou a vpravo suchou cestou. Z obrázků je patrné že supernatanty nad gely se jeví jako čiré roztoky, kromě supernatantu nad gelem s FLUO a 50 mM Septonexem připraveným mokrou cestou, který je lehce zakalený.

Vznik gelu byl závislý na použitém Septonexu. Nejvíce gelu vznikalo s využitím 200 mM Septonexu, naopak nejméně gelu vznikalo s využitím 50 mM Septonexu. Konzistence gelu zase závisela na použitém hyaluronanu. Hydrogely s 200 mM Septonexem a hyaluronanem o nižší koncentraci byly poměrně tekutější než pro gely s hyaluronanem o vyšší koncentraci,

kté byly poměrně rigidnější. To je např. patrné na Obr. 20, kde pro gel s 200 mM Septonexem u mokré cesty stéká dolů po stěně vialky. Naopak rigidní gel je patrný např. na Obr. 29 v kapitole 9.3.

5.3. Solubilizační kapacita hydrogelů – UV-VIS spektrofotometrie

Solubilizační kapacita hydrogelů byla sledována po 24, 48 a 72 hodinách od doby přípravy. Hydrogely byly ponechány ve tmě a za laboratorní teploty. Koncentrace uvolněné látky byla zjištěna z kalibračních křivek fluoresceinu a AO v roztoku NaCl, které jsou uvedené v kapitole 5.1. Pomocí rovnice regrese byl vyjádřen člen x , za hodnotu y byla dosazena naměřená hodnota absorbance a následně bylo možné hodnotu x vypočítat, jako koncentraci uvolněné látky v supernatantu. Solubilizační kapacita byla porovnána podle použití fluorescenční sondy. Pro hydrogely, které byly připravené mokrou cestou, je jejich solubilizační kapacita znázorněna v Tab. 4 a pro hydrogely připravené suchou cestou v Tab. 11 v kapitole 9.4. U měření absorbance UV-VIS spektrofotometrem nastal problém u zakalených supernatantů, kdy hodnota absorbance byla většinou i vyšší než 1. To je dáno tím, že v zakaleném roztoku jsou částice, které způsobují rozptyl procházejícího záření. Tento jev nastal i u vzorků, kdy se supernatant pouhým okem zdál jako čirý, ale po měření byla hodnota absorbance opět vyšší. To pak mělo vliv i na hodnotu koncentrace, která vycházela mnohem vyšší než koncentrace dané látky, která byla do systému přidána (1 μ M). Do porovnání tak lze vzít ty hydrogely, jejichž supernatant obsahoval danou látku s koncentrací nižší.

Tab. 4:: Porovnání solubilizační kapacity u hydrogelů připravených mokrou cestou, do kterých byl solubilizován FLUO a AO. Hydrogely byly připraveny s HYA 9, 8 a 14 a byly pozorovány po 24, 48 a 72 hodinách.

MOKRÁ CESTA - FLUO			MOKRÁ CESTA - AO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 9			Hydrogely - 24 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]	Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	2,10E-05	20 980,3	50 mM	1,72E-05	17 228,4
100 mM	2,16E-06	2 159,1	100 mM	9,69E-07	969,2
200 mM	9,67E-07	967,3	200 mM	7,00E-07	700,4
Hydrogely - 24 hodin s HYA 8			Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]	Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	5,20E-05	52 014,8	50 mM	5,54E-05	55 400,4
100 mM	2,86E-06	2 860,6	100 mM	4,40E-05	44 002,8
200 mM	3,46E-07	345,7	200 mM	1,40E-06	1 403,4
Hydrogely - 48 hodin s HYA 9			Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]	Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	1,74E-05	17 396,4	50 mM	1,67E-05	16 704,4
100 mM	3,99E-06	3 993,4	100 mM	3,70E-06	3 697,5
200 mM	1,29E-06	1 291,8	200 mM	2,23E-07	222,8

MOKRÁ CESTA - FLUO		
Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	2,63E-05	26 259,1
100 mM	6,89E-06	6 894,9
200 mM	1,45E-06	1 450,5

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	5,94E-07	593,9
100 mM	3,97E-07	396,5
200 mM	6,45E-07	644,5

Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	4,69E-07	469,0
100 mM	5,73E-07	573,3
200 mM	2,08E-07	207,7

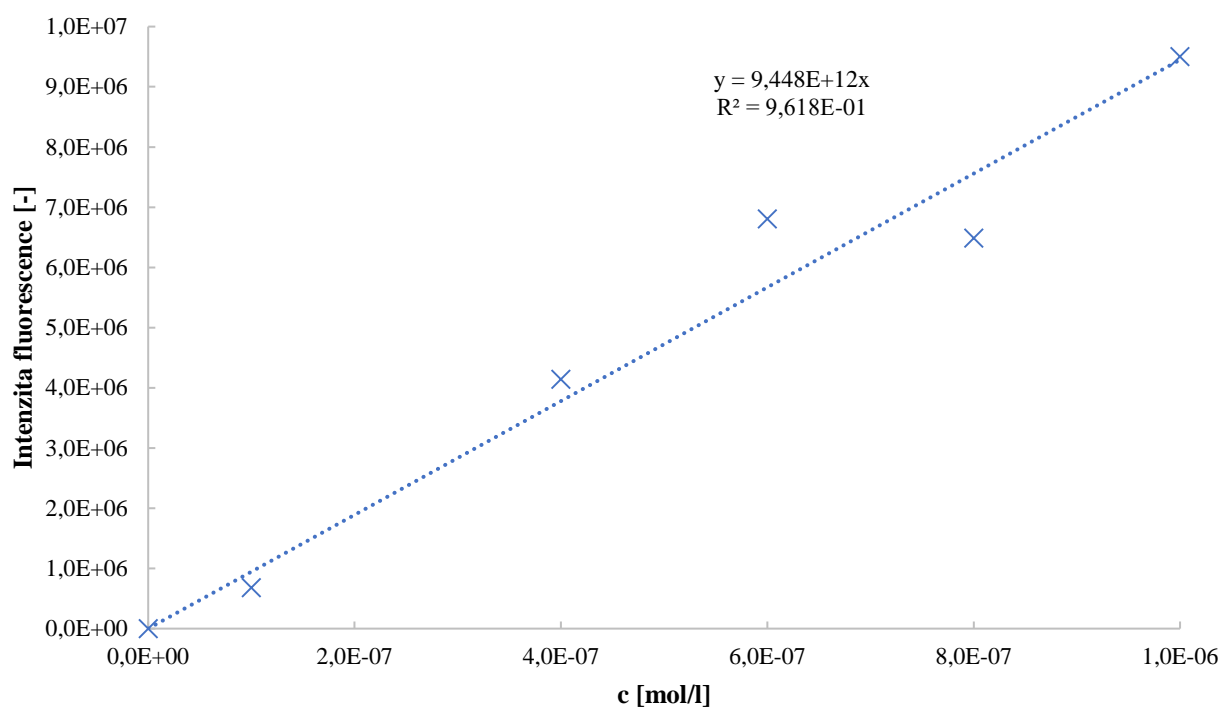
MOKRÁ CESTA - AO		
Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	3,67E-05	36 706,0
100 mM	9,77E-06	9 770,8
200 mM	3,34E-07	333,9

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	1,82E-07	182,3
100 mM	1,12E-07	112,2
200 mM	1,44E-07	144,5

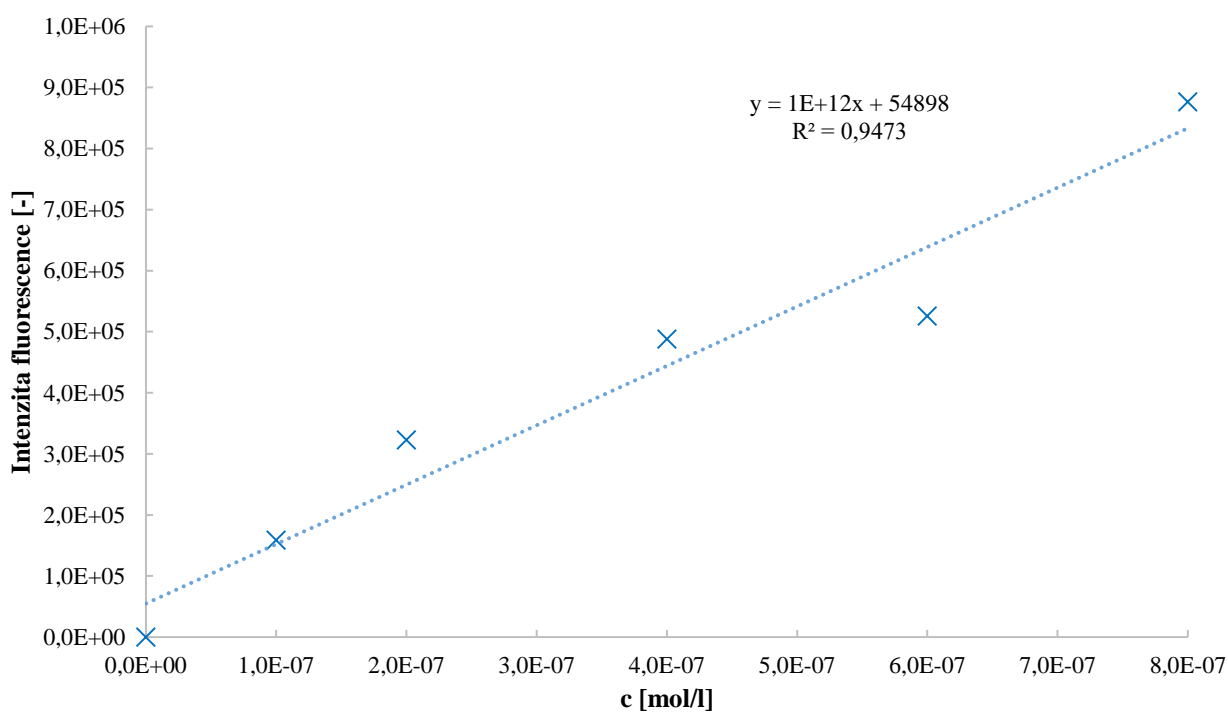
Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	3,08E-06	3 079,3
100 mM	3,69E-07	369,5
200 mM	2,10E-07	209,7

5.4. Kalibrační křivky – MicroTime 200

Protože u zakalených vzorků supernatantu nastal problém s naměřením absorbance, kdy docházelo ke značnému rozptylu a tím naměření vysokých hodnot absorbancí, byla zvolena metoda pomocí FCS, a to systém MicroTime 200. K tomu bylo potřeba proměřit koncentrační řady fluoresceinu a AO a sestavit kalibrační přímky, což je v tomto případě závislost intenzity fluorescence na koncentraci. Volba této metody měření byla zvolena proto, že zde by neměl vadit zakalený vzorek, jako je tomu jak u UV-VIS spektrofotometru, tak i u fluorimetru. Jednalo se o zkušební měření, zda tento přístroj je možné na dané vzorky použít. Proto byla zvolena pro obě fluorescenční sondy koncentrační řada o maximálně 6 bodech a koncentrační řada byla proměřena jen jednou. Kalibrační přímka pro fluorescein v roztoku NaCl je zobrazena na Obr. 22 a pro AO v roztoku NaCl je zobrazena na Obr. 23.



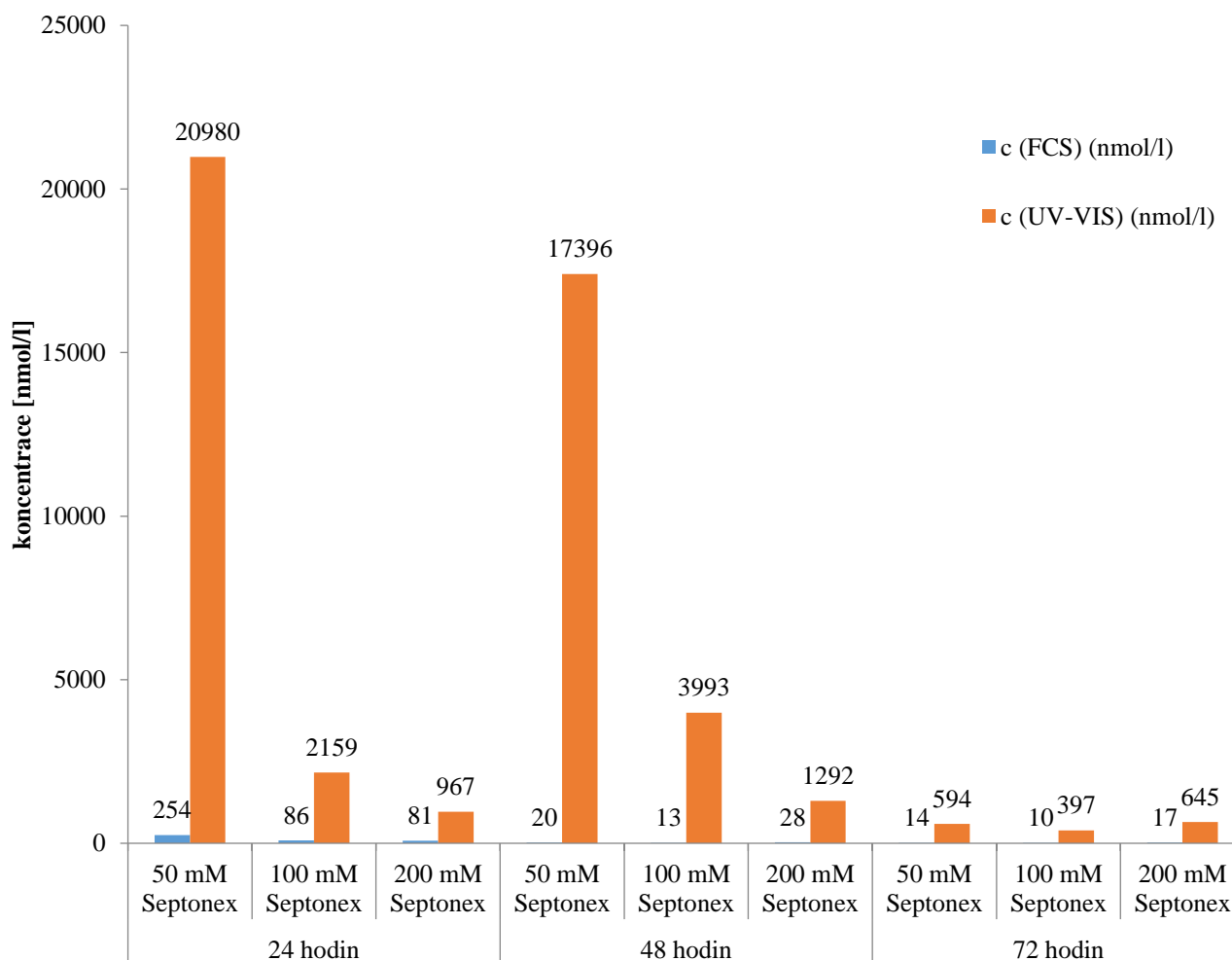
Obr. 22: Kalibrační křivka pro FLUO v roztoku NaCl



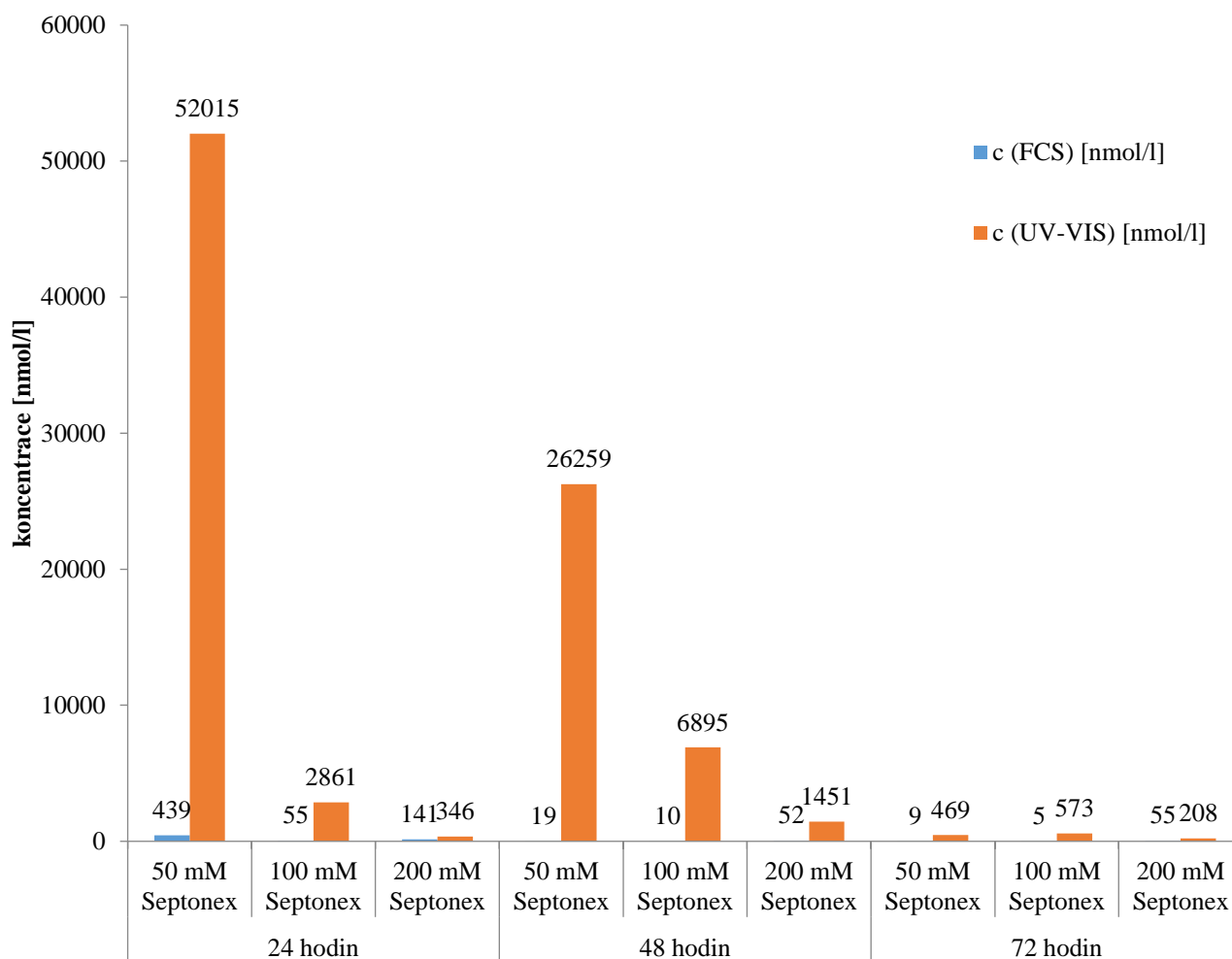
Obr. 23: Kalibrační křivka pro AO v roztoku NaCl

5.5. Solubilizaační kapacita hydrogelů – systém MicroTime 200

I v tomto případě byla solubilizační kapacita hydrogelů sledována po 24, 48 a 72 hodinách od jejich přípravy. Koncentrace uvolněné látky byla zjištěna z kalibračních křivek fluoresceinu a AO v roztoku NaCl, jejichž postup sestavení je popsán v kapitole 5.4. Výsledné hodnoty pro mokrou cestu jsou shrnuty v Tab. 12 a pro suchou cestu v Tab. 13 v kapitole 9.5. Do porovnání koncentrací z kalibračních přímek pomocí UV-VIS spektrofotometrie lze vzít jen ty hodnoty, které byly naměřeny u čirých supernatantů, což je pro hydrogely s 200 mM Septonexem, které byly proměřeny po 72 hodinách. Některé vzorky se ale na první pohled jevily jako číré, po změření absorbance byly ale vyhodnoceny jako stále zakalené. Přístroj MicroTime 200 je velice přesný a zakalený vzorek by neměl být překážkou v naměření výsledků. U UV-VIS spektrofotometru mohl nastat problém jak u zakaleného vzorku, jak už bylo zmiňováno výše, tak u velmi nízkých koncentrací, které se do supernatantu z gelu uvolnilo. Tyto koncentrace byly tak nízké, že se nacházely v oblasti neplatnosti Lambert-Beerova zákona a měření tak bylo zatíženo velkou chybou.

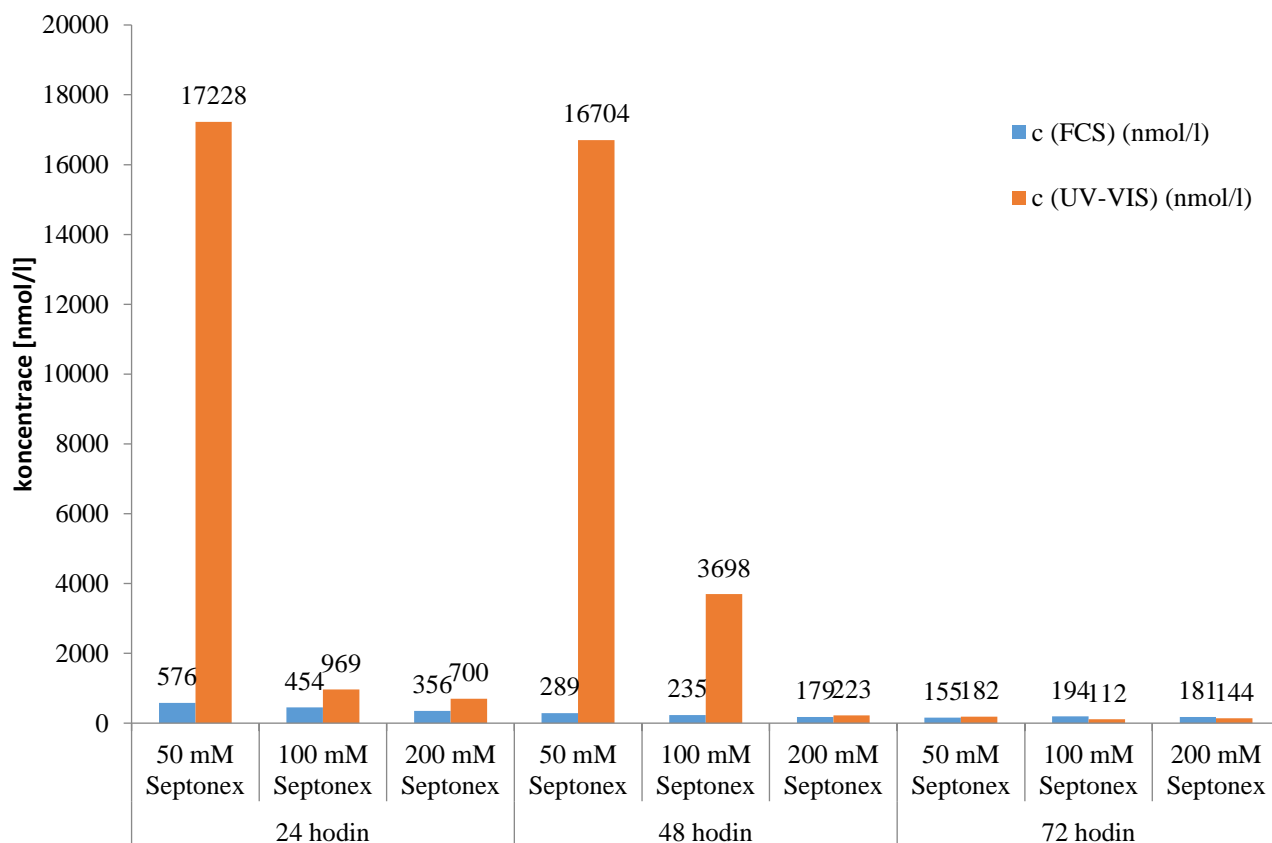


Obr. 24: Závislost koncentrace pro gely připravené mokrou cestou s HYA 9 a FLUO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS, s rozdílem, že hodnoty z FCS jsou velmi nízké.

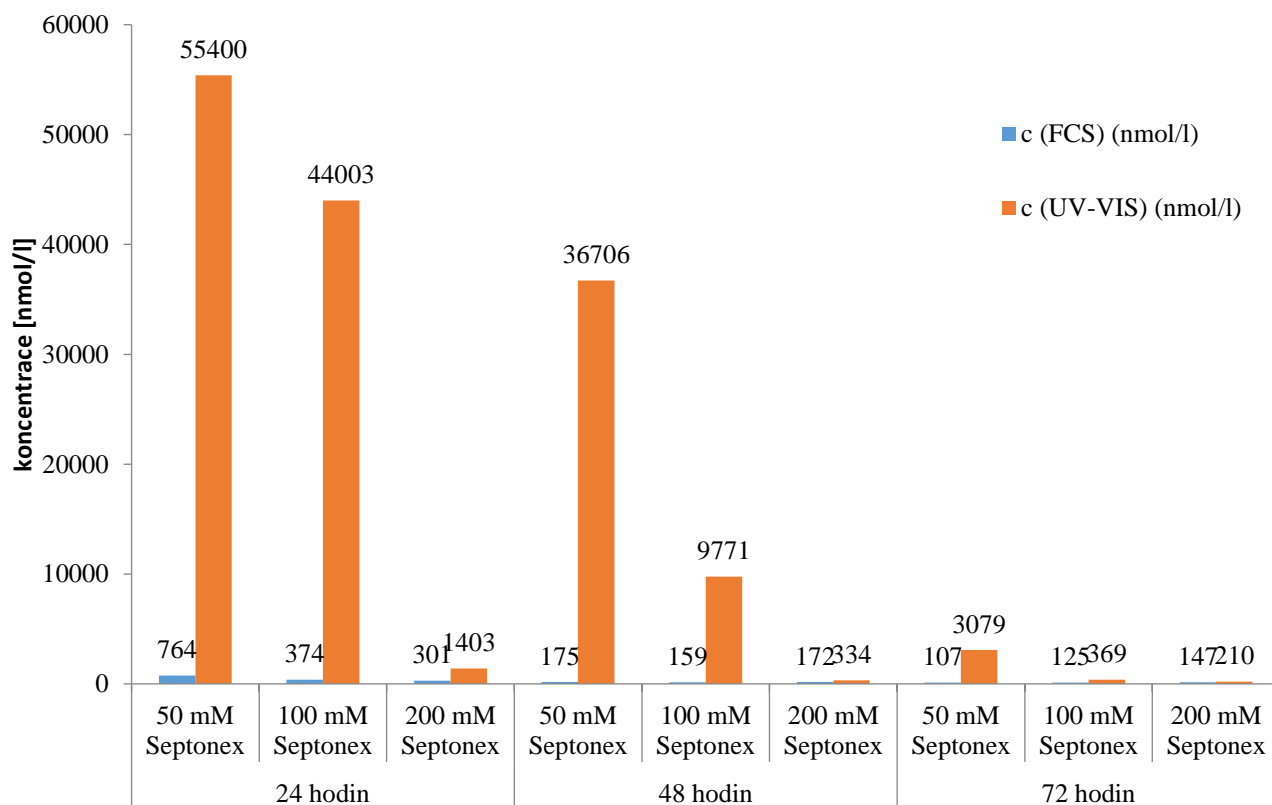


Obr. 25: Závislost koncentrace pro gely připravené mokrou cestou s HYA 8 a FLUO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS, s rozdílem, že hodnoty z FCS jsou velmi nízké.

Závislost koncentrace pro různé gely, které byly připravené mokrou cestou s FLUO, jsou uvedeny na Obr. 24 a Obr. 25. Z těchto grafů si lze všimnout, že nejméně se uvolňuje po 72 hodinách od jejich přípravy, a to z gelů s 50 mM Septonexem. To platí jak pro HYA 9, tak pro HYA 8. U HYA 8 se ale méně látka uvolňuje po 48 hodinách než u HYA 9 s nižší molekulovou hmotností. Pro AO jsou grafy uvedeny na Obr. 26 a Obr. 27. I zde platí stejná závislost, jako pro FLUO. Jen množství uvolněné látky je poměrně vyšší. Všechny grafy pro suchou cestu jsou přiloženy v kapitole 9.5. Z těchto výsledků si lze všimnout, že nejvíce se uvolnilo FLUO i AO po 48 hodinách z gelů s HYA 9. Pro gely s HYA 14 to neplatí a opět se nejvíce látky uvolnilo po 24 hodinách. Pro všechny varianty platí fakt, že nejméně se z gelů daná látka uvolňuje po 72 hodinách.



Obr. 26: Závislost koncentrace pro gely připravené mokrou cestou s HYA 9 a AO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách.



Obr. 27: Závislost koncentrace pro gely připravené mokrou cestou s HYA 8 a AO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na určení solubilizační kapacity hydrogelů, která byla stanovena primárně metodou UV-VIS spektrofotometrie po 24, 48 a 72 hodinách od jejich přípravy. Nutnou součástí tohoto experimentu bylo proměření kalibračních křivek solubulizovaných látek. Jelikož u většiny hydrogelů vznikl zakalený supernatant, docházelo tak k rozptylu záření a tuto metodu nebylo možné použít. Zvolila se proto metoda FCS, kde se využíval přístroj MicroTime 200 jako fluorimetr a měřila se závislost naměřené intenzity fluorescence na koncentraci.

Hydrogely byly připravovány dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo smíchání hyaluronanu a Septonexu v práškové formě, tzv. suchá cesta, nebo se tyto látky smíchaly v podobě roztoků, tzv. mokrá cesta. K přípravě hydrogelů byl využit hyaluronan o výsledné koncentraci 2 hm. % a Septonex o třech výsledných koncentracích, a to 50, 100 a 200 mM. Gel vznikl v prostředí roztoku 0,15 M NaCl. K sledování solubilizační kapacity byly použity dvě fluorescenční sondy, jakožto solubilizované látky. Kladně nabitá akridinová oranž a záporně nabitý fluorescein.

U stanovení solubilizační kapacity pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie byly výsledky zatíženy značnou chybou. To je v důsledku vzniku zakalených supernatantů a použití fluorescenční sondy o velmi nízké koncentraci, při kterých jsou hodnoty absorbance poměrně malé, a v téhle oblasti koncentrací se nedá předpokládat platnost Lambert-Beerova zákona. Z těchto důvodů byla použita metoda založená na měření intenzity fluorescence na přístroji MicroTime 200, kde není problém ani se zakalenými roztoky, tak ani s nízkými koncentracemi daných látek. Pro určení solubilizační kapacity jsou tyto výsledky relevantní a budou brány v úvahu při jejich shrnutí.

Solubilizační kapacitu hydrogelů lze porovnat z několika hledisek. Jedním z nich je způsob přípravy. Hydrogely byly připravovány mokrou a suchou cestou. Nebyl potvrzen předpoklad, že se daná látka bude méně uvolňovat z gelů připravených mokrou cestou, kde by interakce mezi přítomnými molekulami polymeru, tenzidů a fluorescenčních sond by měla probíhat snáze než u těchto látek v práškové formě, které se musí nejdříve rozpustit. Toto tvrzení neplatí vždy a u hydrogelů pozorovaných 24 hodin od přípravy platí opak. Dále lze kapacitu porovnat podle použitého polymeru. U gelů s hyaluronanem o nižší molekulové hmotnosti by se daná látka měla uvolňovat snáze než u hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti. Tento předpoklad opět nelze potvrdit u všech případů. Např. u gelů, které byly pozorovány po 24 a 48 hodinách od jejich přípravy. To je pravděpodobně způsobené tím, že pro nízkomolekulární hyaluronan vznikl gel tekutý a v roztoku se rozpouštěl, tím by se z roztoku nad gelem uvolnilo více solubilizované látky než u vysokomolekulárního hyaluronanu, kdy gel byl tuhý a pevný.

Uvolňování solubilizované látky z hydrogelu lze také popsat na základě použitého Septonexu. Pro tenzid s nejnižší koncentrací 50 mM se z gelu po 72 hodinách zpravidla uvolnilo nejméně. Naopak nejvíce se uvolňovala sonda z gelu s 200 mM Septonexem, což je způsobené jeho rozpouštěním, jak už bylo popsáno v odstavci výše. Po 24 hodinách se

v supernatantu vždy nacházelo více sondy, pokud byl použit tenzid o koncentraci 50 mM. Po 48 hodinách nejde jednoznačně určit pro jaké koncentrace tenzidu se uvolnilo nejvíce látky. U gelů, které byly pozorovány po 72 hodinách od jejich přípravy se v 75 % nejvíce látky uvolnilo z gelů s 200 mM Septonexem. Z 25 % se pak uvolnilo nejvíce látky z gelů se 100 mM Septonexem. Poslední porovnání solubilizační kapacity je podle použité fluorescenční sondy. Nejméně se uvolňoval fluorescein. Jedná se o záporně nabitou molekulu, která tak bude interagovat s kladně nabitým tenzidem. Ten ve vodném prostředí tvoří Hartleovy micely, na jejichž povrch se solubilizuje fluorescein, protože se jedná o hydrofilní molekulu. Naopak AO je kladně nabitá a bude tak interagovat s volnými náboji na hyaluronanu, jejichž koncentrace v roztoku je menší než koncentrace kladného náboje tenzidů tvořící micely.

7. LITERATURA

[1] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005, ISBN 80-7080-579-X.

[2] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.

[3] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.

[4] POUCHLÝ, J. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd., Praha: VŠCHT. 2001, s. 147-164. ISBN 80-7080-422-X.

[5] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT. Hydrogel Biomaterials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* [online]. InTech, 2011 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.5772/24856. ISBN 978-953-307-309-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>

[6] OKAY O.: *General properties of Hydrogels*, in G.Gerlach and K.-F. Arndt, eds., Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical sensors and Biosensors, volume 6, pp. 1-14, Springer 2009

[7] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>

[8] LIN, Chien-Chi a Andrew T. METTERS. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, **58**(12-13), 1379-1408 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.004. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X06001694>

[9] ZARZYCKI, Roman, Zofia MODRZEJEWSKA a Katarzyna NAWROTEK. Drug release from hydrogel matrices. *Ecological chemistry and engineering* [online]. 2010, **17**(2), 1-20

[10] DAUTZENBERF, H., W. JAEGER, J. KÖTZ, B. PHILIPP, Ch. SEIDEL, D. STSCHERBINA: *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser/Gardner Publications, Inc, 1994, str. 1-3, ISBN 3-446-17127-3

[11] The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. *Hyaluronic Acid* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015, s. 1 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1002/9781118695920.ch1. ISBN 9781118695920. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118695920.ch1>

[12] HASCALL, V., LAURENT, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 2014-04-29]. Dostupné také z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#IV>.

[13] SCOTT, J.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 2014-04-12]. Dostupné také z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

[14] LAPČÍK, L., Jr., LAPČÍK, L. De SMEDT, S., DEMEESTER, J., CHABREČEK, P.: Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 1998, roč. 98, č. 8, s. 2663-2684

[15] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers* [online]. Sciyo, 2010 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>

[16] NECAS, J., BARTOSKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review [online]. *Veterinarni medicina*. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397-411 [cit. 2014-04-13]. Dostupné také z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>

[17] RAH, M.: A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry* [online]. 2011, roč. 82, č. 1, s. 38–43 [cit. 2014-04-15]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1529183910005129>

[18] PETRÁK, K.: Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Delivery Today* [online]. 2005, roč. 10, č. 23–24, s. 1667–1673 [cit. 2014-04-28]. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644605036986>

[19] NORDIC Pharma, s.r.o: *Problematika srůstů*, [online]. 2013, [citováno: 2013-12-10]. dostupné online na www.nordicpharma.cz

[20] Hyodine [online]. [cit. 2014-04-12]. Dostupné také z: <http://www.hyiodine.cz/spatne-hojeni-ran>

[21] ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chem. Listy* 93 [online]. 1999, s. 421-427. [cit. 2016-03-29]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf

[22] HOLMBERG, T., B. JÖNSSON, B. KRONBERG, B. LINDMAN. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. 2002. [online]. ISBN 0-471-49883-1. Dostupné z: <http://www.files.rushim.ru/books/polimers/surfactants-and-polymers-in-aqueoussolution.pdf>

[23] ZÁRUBA L., DORNÍKOVÁ G., ŠKODA J.: *Tenzidy?Tenzidy! (modifikace léčebné vložky a výplachu v endodoncii)*, [online]. 2007, [citováno: 2013-12-10]. dostupné online: www.ladislavzaruba.eu/files/tenzidy.pdf

[24] MOHAMED, Gehad G., M. F. EL-SHAHAT, A. M. AL-SABAGH, M. A. MIGAHED a Tamer Awad ALI. Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. *The Analyst* [online]. 2011, **136**(7), 1488- [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>

[25] OTAVOVÁ, Tereza. *Hodnocení účinnosti dezinfekce operačního pole na operačních sálech (mikrobiologická studie)*. Pardubice, 2009. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta zdravotnických studií, Katedra ošetrovatelství. Vedoucí práce doc. MUDr. Jan Novák, CSc. Dostupné také z: http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/33630/OtavovaT_Hodnoceni%20ucinnosti_JN_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y

[26] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: Wiley-VCH, c2002. ISBN 3-527-29919-x

[27] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [cit. 2007-11-9]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>

[28] SJÖBACK, R., J. NYGREN, M. KUBISTA: Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 1995, vol. 51, Issue 6, pp. L7-L21

[29] Fluorescein (FITC). *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html?icid=fr-fitc-main>

[30] *Sigma-Aldrich: Fluorescein* [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/46955?lang=en&ion=CZ>

[31] COSTANTINO, Lucia; GUARINO, Gennaro; ORTONA, Ornella; VITAGLIANO, Vincenzo. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1984, 29, s. 62-66

[32] TAN, J., SCHNEIDER S., R. L.: Dye Binding and Its Relation to Polyelectrolyte Conformation. *The Journal of Physical Chemistry*, 1975, vol. 79, No. 14, pp. 1380

[33] YAO, H., K. KOBAYASHI, K. KOMÁRA: Self-assembly of akridine orange dye at a mica/solution interface: Formation of nanostripe supramolecular architectures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 307, pp. 272-279

[34] KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*, 2013, nakladatelství Pavel Klouda, ISBN: 80-86369-07-2

[35] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5

- [36] BARTUŠEK, Miloš a Jiří PAZOUŘEK. *Základy metod analytické chemie*
- [37] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [38] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 0-387-31278-1
- [39] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1989, **93**(4), 1478-1483 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [40] SHULEVICH, Yulia V., Gudrun PETZOLD, Alexander V. NAVROTSKII a Ivan A. NOVAKOV. Properties of polyelectrolyte–surfactant complexes obtained by polymerization of an ionic monomer in a solution of an oppositely charged surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2012, **415**, 148-152 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.10.013. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775712006899>
- [41] SAUEROVÁ, Pavla, Martina VERDÁNOVÁ, Filip MRAVEC, Tereza PILGROVÁ, Tereza VENEROVÁ, Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **483**, 155-161 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.058. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715300741>
- [42] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2011, **391**(1-3), 25-31 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775711003621>
- [43] BUCHOLD, Philipp, Ralf SCHWEINS, Zhenyu DI a Michael GRADZIELSKI. Structural behaviour of sodium hyaluronate in concentrated oppositely charged surfactant solutions. *Soft Matter* [online]. 2017, **13**(11), 2253-2263 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1039/C6SM02742C. ISSN 1744-683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM02742C>
- [44] CAICCO, Matthew J., Michael J. COOKE, Yuanfei WANG, Anup TULADHAR, Cindi M. MORSHEAD a Molly S. SHOICHET. A hydrogel composite system for sustained epi-cortical delivery of Cyclosporin A to the brain for treatment of stroke. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, **166**(3), 197-202 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.002. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365913000084>

8. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1. Seznam použitých zkratk

AO	akridinová oranž
CMC	kritická micelární koncentrace
CsA	Cyklosporin A
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
ECM	extracelulární matrix
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FLUO	fluorescein
HA	kyselina hyaluronová
Hya	hyaluronan
PLGA	poly(mléčna-ko-glykolová) kyselina
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid

8.2. Seznam použitých symbolů

A	absorbance
T	transmittance
c	koncentrace
ϵ	molární extinkční koeficient
l	optická dráha
$v_{2,s}$	objemový podíl polymeru
V_p	objem polymeru
V_g	objem gelu
ξ	velikost ok sítě hydrogelu
V_1	molární objem vody
N_A	tok léčivé látky
G_A	rychlost přestupu hmoty
k_L	koeficient přestupu hmoty
C_{AL}^*	koncentrace léčiva na povrchu
C_{AL}^δ	koncentrace léčiva v objemu kapalné fáze
A	plocha
D	difúzní koeficient
M_t	množství léčiva
t	čas
l	tloušťka membrány
J_{lim}	limitující difúzní tok
C_s	rozpustnost léčiva
C_0	počáteční koncentrace
M_∞	absolutní množství léčiva
M_w	molekulová hmotnost
I_F	intenzita fluorescence

9. PŘÍLOHY

9.1. Příprava kalibračních roztoků

Tab. 5: Kalibrační řada koncentrací fluoresceinu [$\mu\text{mol/l}$] pro jednotlivá rozpouštědla (pro UV-VIS spektrofotometrii)

Kalibrační řada koncentrací pro fluorescein v:								
NaCl	1	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	15	20	25	30	35	40
Deionizovaná voda	1	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	15	20	25	30	35	40
50 mM Septonex	1	2	4	6	8	10	15	20
	25	30	35	40				
100 mM Septonex	1	2	4	6	8	10	15	20
	25	30	35	40				
200 mM Septonex	1	2	4	6	8	10	15	20
	25	30	40	50	60	70		

9.2. Kalibrační křivky – UV-VIS spektrofotometrie

Tab. 6: Hodnoty absorbance (A_1 , A_2 , A_3) kalibračních roztoků fluoresceinu v roztoku NaCl a jejich střední hodnota A

c [$\mu\text{mol/l}$]	A_1 [-]	A_2 [-]	A_3 [-]	A [-]
0	0,01	0,01	0,01	0,01
1	0,07	0,07	0,06	0,07
2	0,12	0,09	0,07	0,10
3	0,12	0,11	0,10	0,11
4	0,21	0,14	0,12	0,16
5	0,18	0,14	0,15	0,16
6	0,23	0,20	0,20	0,21
7	0,27	0,25	0,33	0,28
8	0,34	0,24	0,34	0,31
9	0,35	0,29	0,35	0,33
10	0,40	0,32	0,34	0,35
15	0,65	0,51	0,54	0,56
20	0,92	0,69	0,80	0,81
25	1,02	0,92	0,96	0,97
30	1,29	1,28	1,30	1,29
35	1,61	1,43	1,46	1,50
40	1,77	1,68	1,74	1,73

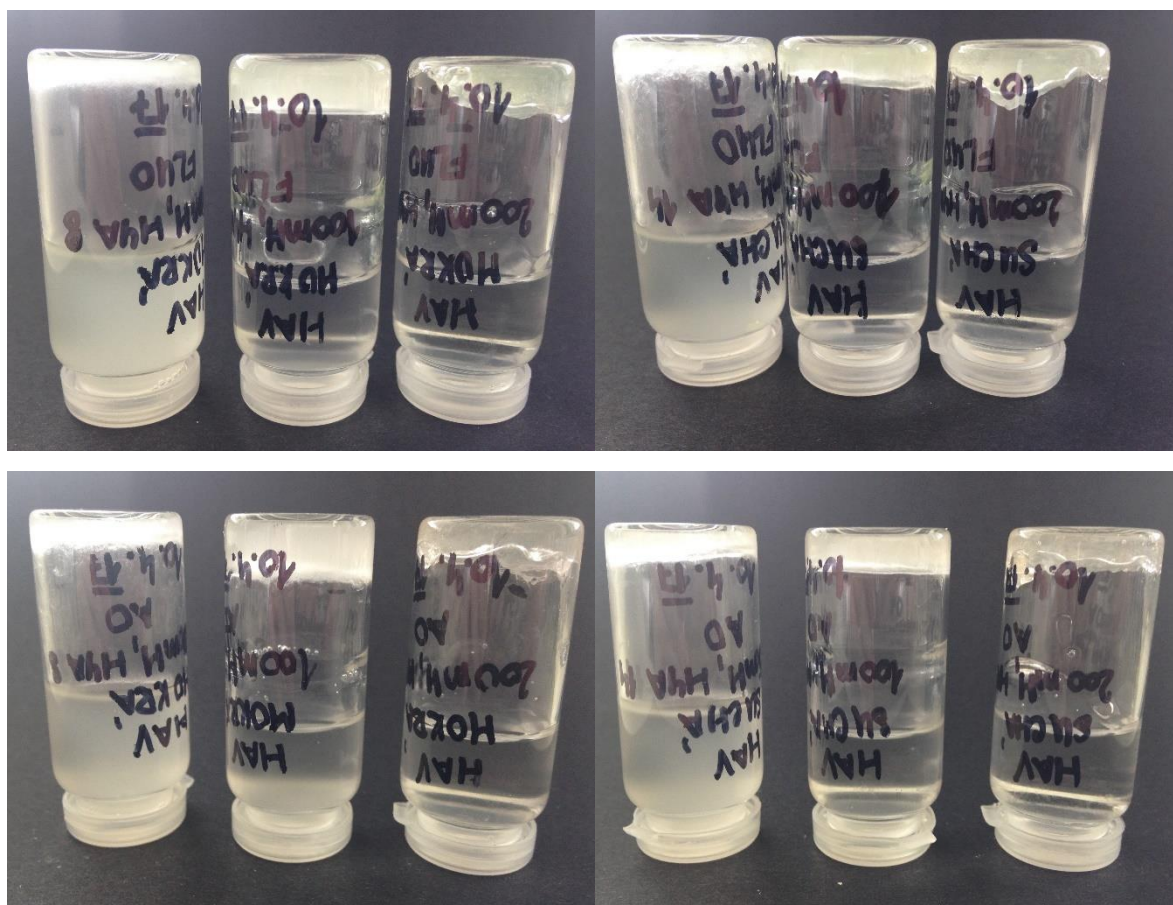
Tab. 7: Hodnoty absorbance (A_1 , A_2 , A_3) kalibračních roztoků AO v roztoku NaCl a jejich střední hodnota A

c [$\mu\text{mol/l}$]	A_1 [-]	A_2 [-]	A_3 [-]	A [-]
0	0,01	0,01	0,01	0,01
1	0,04	0,04	0,05	0,05
2	0,09	0,08	0,08	0,09
3	0,13	0,13	0,12	0,13
4	0,17	0,17	0,16	0,17
5	0,21	0,21	0,21	0,21
6	0,23	0,24	0,23	0,23
7	0,27	0,28	0,27	0,27
8	0,31	0,32	0,31	0,31
9	0,36	0,35	0,33	0,35
10	0,37	0,37	0,38	0,38
15	0,52	0,53	0,53	0,53
20	0,68	0,68	0,68	0,68
25	0,80	0,79	0,81	0,80
30	0,92	0,93	0,96	0,94
35	1,05	1,06	1,04	1,05
40	1,16	1,17	1,19	1,17

9.3. Příprava hydrogelů

Tab. 8: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti (HYA 8 a 14) se Septonexem o třech různých koncentracích spolu s fluoresceinem a AO. Poté byly sledovány po 24 hodinách od jejich přípravy

Hydrogely - 24 hodin				
	Mokrý cesta (HYA 8)		Suchá cesta (HYA 14)	
Použitý Septonex	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	viskózní a zakalený	viskózní a zakalený	viskózní a zakalený	viskózní a zakalený
100 mM	lehce zakalený	zakalený	lehce zakalený	lehce zakalený
200 mM	čirý	čirý	čirý	čirý



Obr. 28: Ukázky hydrogelů připravené smícháním HYA 8 a 14 o vyšší molekulové hmotnosti, Septonexu o třech různých koncentracích (vždy zleva 50, 100 a 200 mM) a FLUO (horní řada) a AO (dolní řada), po 24 hodinách od jejich přípravy. Obrázky se liší způsobem přípravy, kdy vlevo jsou hydrogely připravené mokrou cestou a vpravo suchou cestou. Lze si všimnout zakaleného supernatantu nad gelem s 50 mM Septonexem u obou způsobů přípravy.

Tab. 9: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti (HYA 8 a 14) se Septonexem o třech různých koncentracích spolu s FLUO a AO. Poté byly sledovány po 48 hodinách od jejich přípravy.

Hydrogely - 48 hodin				
	Mokrý cesta (HYA 8)		Suchá cesta (HYA 14)	
Použitý Septonex	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	zakalený	zakalený	zakalený	zakalený
100 mM	lehce zakalený	lehce zakalený	lehce zakalený	čirý
200 mM	čirý	čirý	čirý	čirý



Obr. 29: Ukázky hydrogelů připravené smícháním HYA 8 a 14 o vyšší molekulové hmotnosti, Septonexu o třech různých koncentracích (vždy zleva 50, 100 a 200 mM) a FLUO (horní řada) a AO (dolní řada), po 48 hodinách od jejich přípravy. Obrázky se liší způsobem přípravy, kdy vlevo jsou hydrogely připravené mokrou cestou a vpravo suchou cestou. Lze si všimnout zakaleného supernatantu nad gelem s 50 mM Septonexem a lehkého zákalu se 100 mM Septonexem u obou způsobů přípravy.

Tab. 10: Hydrogely byly připraveny smícháním hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti (HYA 8 a 14) se Septonexem o třech různých koncentracích spolu s FLUO a AO. Poté byly sledovány po 72 hodinách od jejich přípravy.

Hydrogely - 72 hodin				
Použitý Septonex	Mokrý cesta (HYA 8)		Suchá cesta (HYA 14)	
	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO	Supernatant s FLUO	Supernatant s AO
50 mM	čirý	lehce zakalený	čirý	lehce zakalený
100 mM	čirý	čirý	čirý	čirý
200 mM	čirý	čirý	čirý	čirý

Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	3,76E-05	37 630,9
100 mM	1,69E-06	1 694,3
200 mM	1,35E-07	134,7

Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	1,10E-05	10 952,7
100 mM	2,49E-06	2 487,5
200 mM	3,94E-07	393,6

Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	2,35E-05	23 495,5
100 mM	2,93E-06	2 933,7
200 mM	3,56E-07	356,1

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	3,21E-07	321,3
100 mM	2,15E-07	214,8
200 mM	1,73E-07	173,1

Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	2,64E-06	2 635,9
100 mM	4,09E-07	408,6
200 mM	1,29E-07	129,1

Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	4,54E-05	45 417,2
100 mM	2,48E-06	2 477,8
200 mM	1,44E-07	144,5

Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	1,09E-05	10 947,6
100 mM	2,29E-06	2 285,3
200 mM	2,98E-07	298,1

Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	3,23E-05	32 257,1
100 mM	1,60E-06	1 600,0
200 mM	2,97E-07	296,8

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	4,84E-07	484,1
100 mM	1,65E-07	164,6
200 mM	1,34E-07	134,4

Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c [mol/l]	c [nmol/l]
50 mM	2,03E-06	2 031,9
100 mM	3,00E-07	299,5
200 mM	2,04E-07	204,5

9.5. Solubilizační kapacita hydrogelů – systém MicroTime 200

Tab. 12: Vypočtené koncentrace fluoresceinu a AO v supernatantu na hydrogely, které byly připravené mokrou cestou. V tabulce je porovnání jak obou látek, tak i koncentrace zjištěné pomocí kalibračních přímek metodou UV-VIS spektrofotometrie a systémem MicroTime 200.

MOKRÁ CESTA - FLUO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	254,3	20 980,3
100 mM	86,2	2 159,1
200 mM	81,1	967,3

MOKRÁ CESTA - AO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	576,22	17 228,4
100 mM	454,39	969,2
200 mM	355,63	700,4

MOKRÁ CESTA - FLUO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	438,8	52 014,8
100 mM	55,5	2 860,6
200 mM	141,0	345,7

Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	20,4	17 396,4
100 mM	13,2	3 993,4
200 mM	28,2	1 291,8

Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	18,7	26 259,1
100 mM	10,1	6 894,9
200 mM	52,0	1 450,5

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	14,3	593,9
100 mM	10,5	396,5
200 mM	17,5	644,5

Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	8,7	469,0
100 mM	4,6	573,3
200 mM	55,0	207,7

MOKRÁ CESTA - AO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	764,46	55 400,4
100 mM	374,12	44 002,8
200 mM	301,21	1 403,4

Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	288,85	16 704,4
100 mM	234,55	3 697,5
200 mM	179,12	222,8

Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	175,32	36 706,0
100 mM	158,95	9 770,8
200 mM	172,37	333,9

Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	154,88	182,3
100 mM	193,55	112,2
200 mM	181,39	144,5

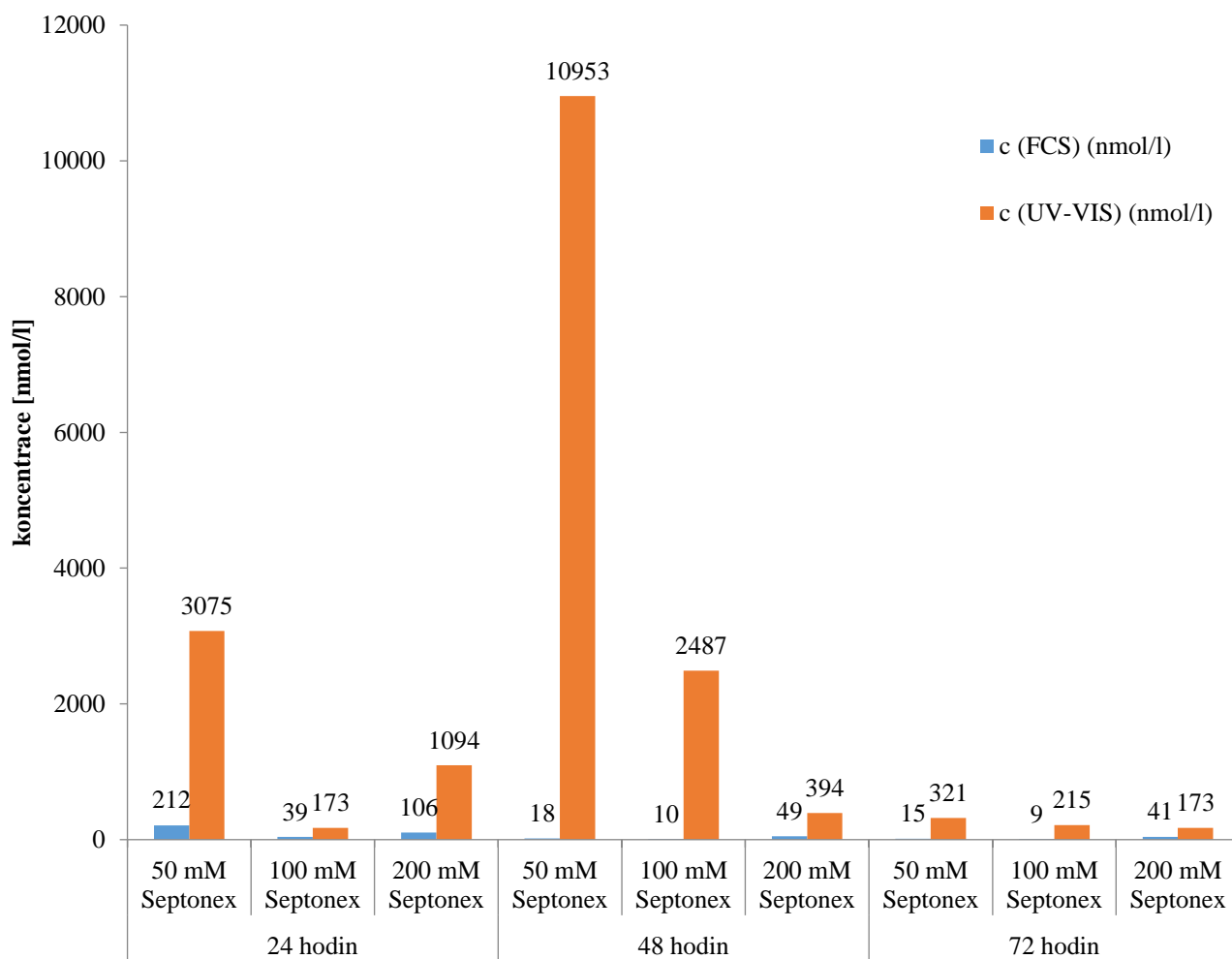
Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	cFCS [nmol/l]	cUV-VIS [nmol/l]
50 mM	107,10	3 079,3
100 mM	125,20	369,5
200 mM	147,34	209,7

Tab. 13: Vypočtené koncentrace fluoresceinu a AO v supernatantu na hydrogely, které byly připravené suchou cestou. V tabulce je porovnání jak obou látek, tak i koncentrace zjištěné pomocí kalibračních přímek metodou UV-VIS spektrofotometrie a systémem MicroTime 200.

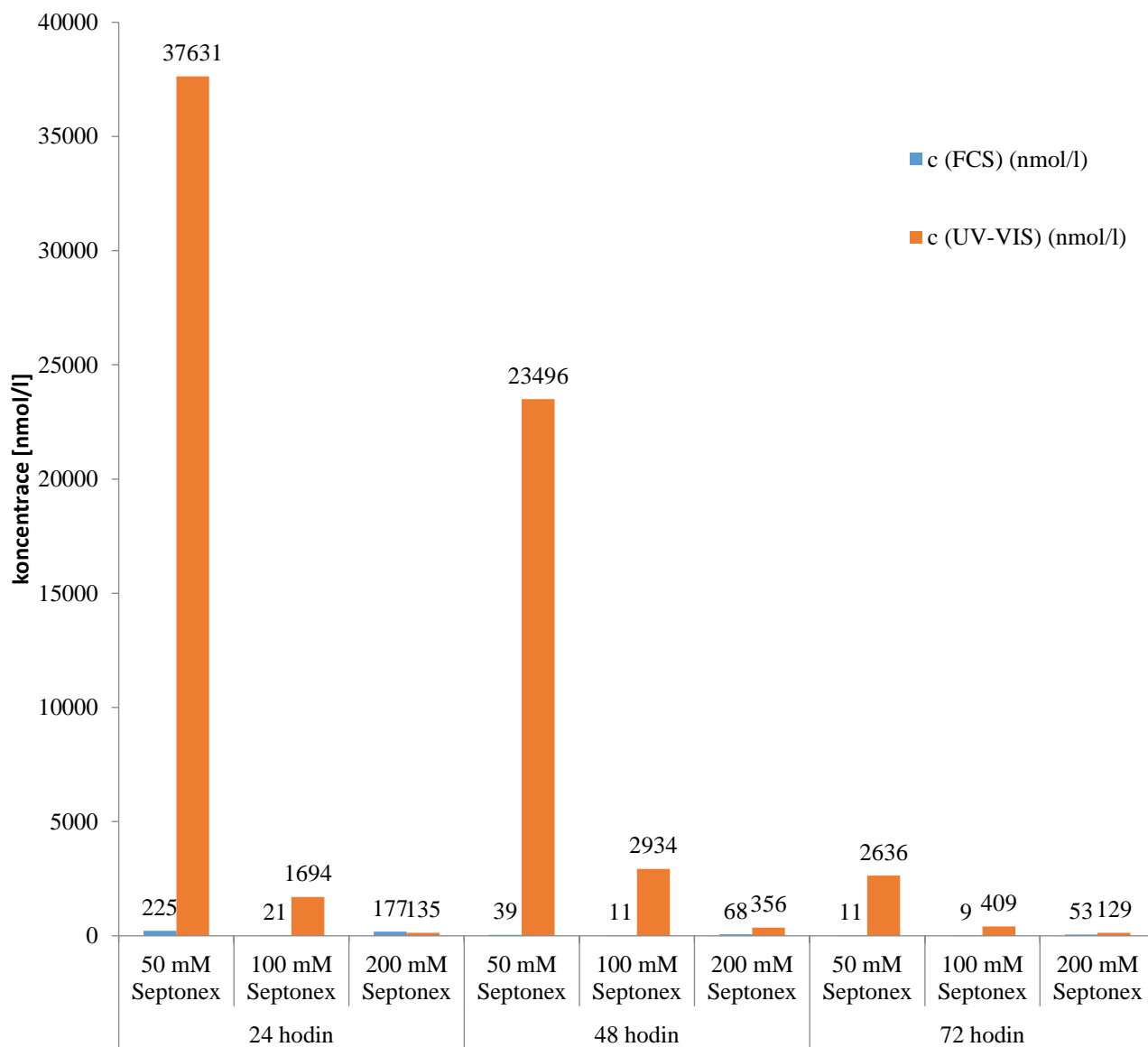
SUCHÁ CESTA - FLUO			SUCHÁ CESTA - AO		
Hydrogely - 24 hodin s HYA 9			Hydrogely - 24 hodin s HYA 9		
Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]	Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]
50 mM	211,9	3 075,3	50 mM	581,83	6 170,0
100 mM	38,8	173,0	100 mM	402,04	356,4
200 mM	105,9	1 094,5	200 mM	311,82	104,9
Hydrogely - 24 hodin s HYA 8			Hydrogely - 24 hodin s HYA 8		
Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]	Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]
50 mM	225,3	37 630,9	50 mM	729,53	45 417,2
100 mM	21,4	1 694,3	100 mM	336,99	2 477,8
200 mM	177,0	134,7	200 mM	273,85	144,5
Hydrogely - 48 hodin s HYA 9			Hydrogely - 48 hodin s HYA 9		
Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]	Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]
50 mM	17,5	10 952,7	50 mM	184,46	10 947,6
100 mM	9,8	2 487,5	100 mM	211,02	2 285,3
200 mM	48,6	393,6	200 mM	178,79	298,1
Hydrogely - 48 hodin s HYA 8			Hydrogely - 48 hodin s HYA 8		
Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]	Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]
50 mM	39,2	23 495,5	50 mM	209,54	32 257,1
100 mM	10,7	2 933,7	100 mM	202,35	1 600,0
200 mM	68,1	356,1	200 mM	150,88	296,8
Hydrogely - 72 hodin s HYA 9			Hydrogely - 72 hodin s HYA 9		
Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]	Septonex	CFCS [nmol/l]	CUV-VIS [nmol/l]
50 mM	14,9	321,3	50 mM	127,90	484,1
100 mM	9,1	214,8	100 mM	177,10	164,6
200 mM	40,7	173,1	200 mM	147,36	134,4

Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c _{FCS} [nmol/l]	c _{UV-VIS} [nmol/l]
50 mM	11,3	2 635,9
100 mM	9,4	408,6
200 mM	52,7	129,1

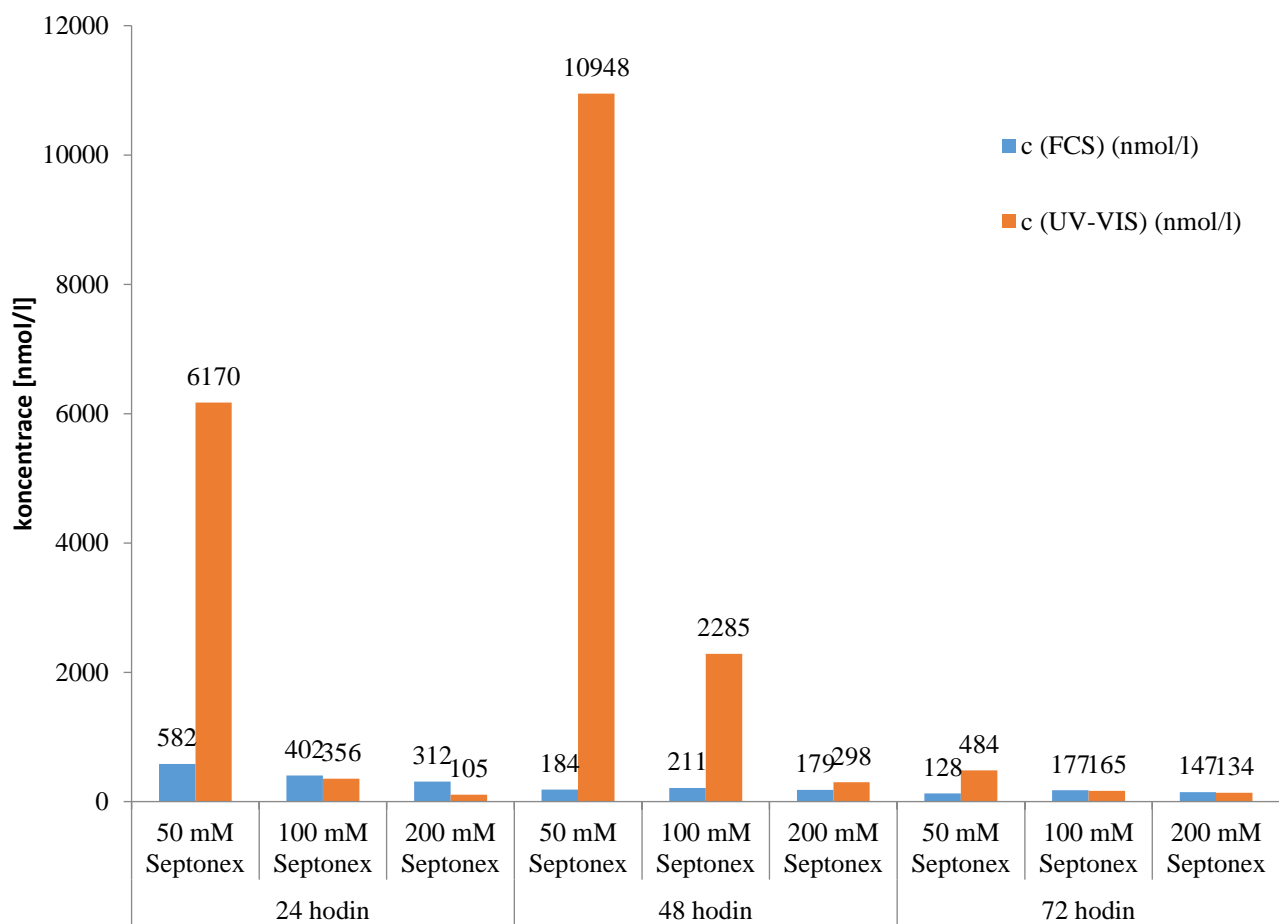
Hydrogely - 72 hodin s HYA 8		
Septonex	c _{FCS} [nmol/l]	c _{UV-VIS} [nmol/l]
50 mM	156,83	2 031,9
100 mM	161,30	299,5
200 mM	126,81	204,5



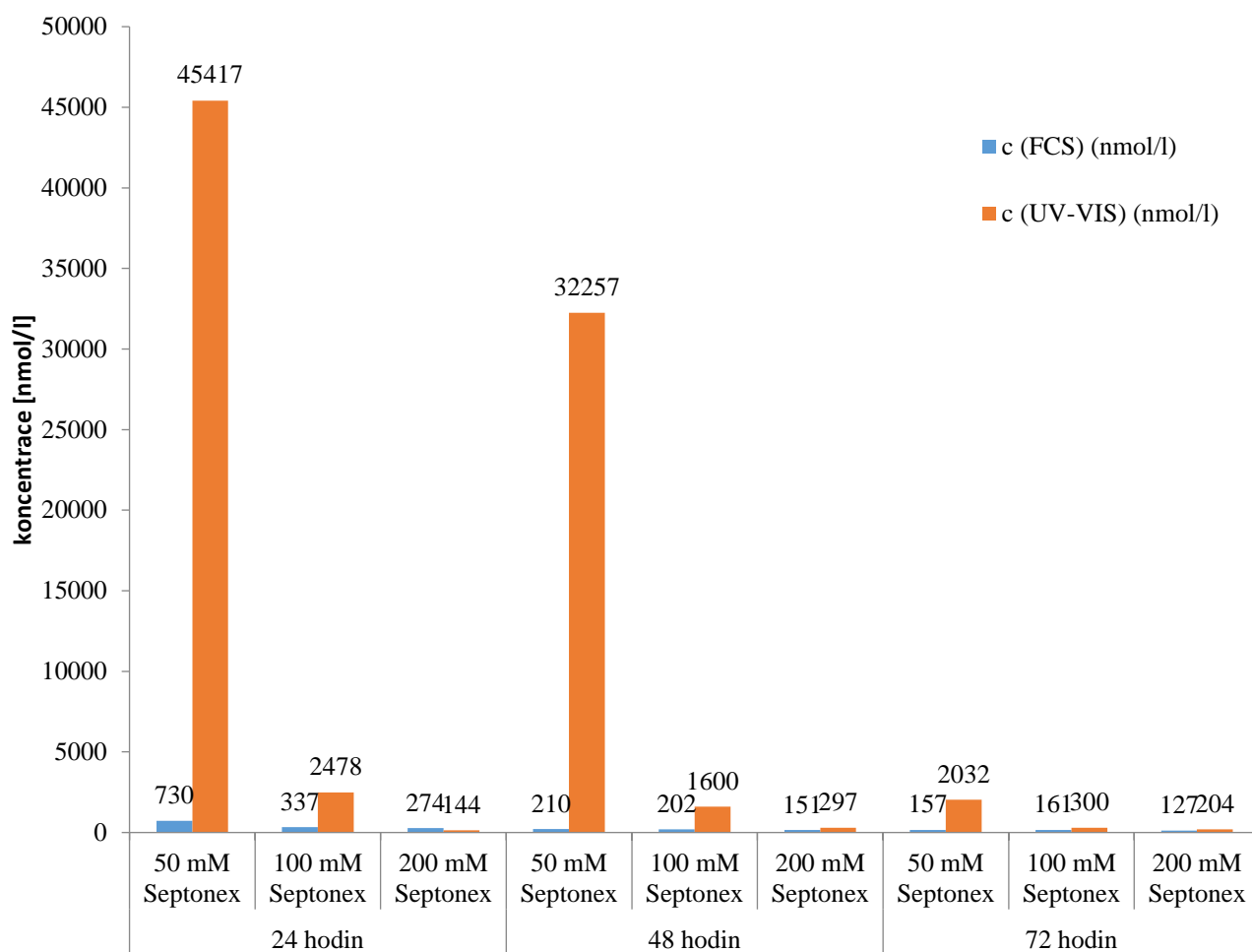
Obr. 31: Závislost koncentrace pro gely připravené suchou cestou s HYA 9 a FLUO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 48 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS, s rozdílem, že hodnoty z FCS jsou velmi nízké



Obr. 32: Závislost koncentrace pro gely připravené suchou cestou s HYA 14 a FLUO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS, s rozdílem, že hodnoty z FCS jsou velmi nízké.



Obr. 33: Závislost koncentrace pro gely připravené suchou cestou s HYA 9 a AO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 48 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS.



Obr. 34: Závislost koncentrace pro gely připravené suchou cestou s HYA 14 a AO v čase. Lze si všimnout, že nejvíce se uvolňuje daná látka po 24 hodinách a nejméně po 72 hodinách. A to i podle UV-VIS i FCS.